

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**LA NEUROGÉNESIS DEL OÍDO INTERNO EN AVES:
FUNCIONES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR
A LA INSULINA TIPO I**



Reg. Fol. 25513

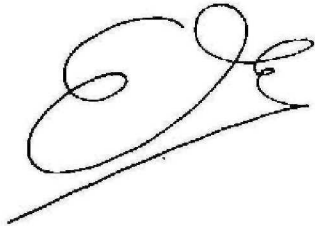
Itziar Gorospe Ugalde, Licenciada en Bioquímica

**Directoras de tesis: Dra. Isabel Varela-Nieto
Dra. Yolanda León Álvarez**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"
CSIC-UAM**

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de SOBRESALIENTE "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD
Madrid, 19/ Diciembre / 2005

LA PRESIDENTE



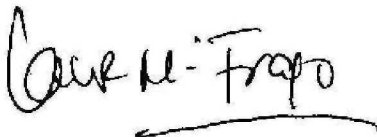
LA SECRETARIA



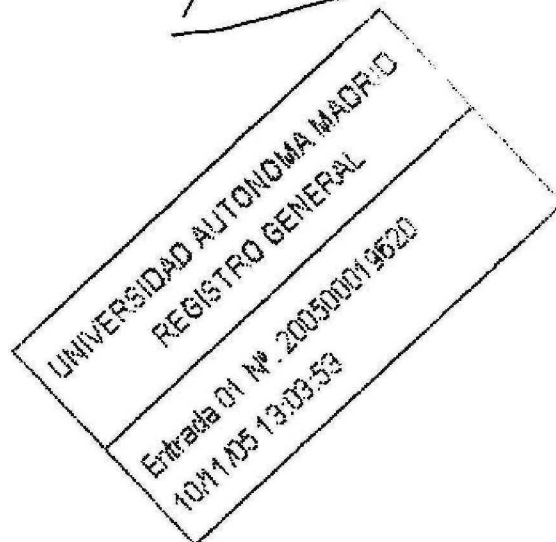
VOCAL 1



VOCAL 2



VOCAL 3





MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"

Memoria presentada por **ITZIAR GOROSPE UGALDE** para optar al grado de **DOCTOR EN BIOQUÍMICA**.

ISABEL VARELA NIETO, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador del CSIC y YOLANDA LEÓN ÁLVAREZ, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Contratado Doctor de la UAM, CERTIFICAN que la Tesis Doctoral titulada **La neurogénesis del oído interno en aves: funciones del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I**, de la que es autora Itziar Gorospe Ugalde, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM de Madrid.

Itziar Gorospe Ugalde ha sido becaria predoctoral en el laboratorio de Neurobiología de la Audición desde septiembre de 2000. El proyecto en el que ha trabajado se ha centrado en el estudio de la generación de las neuronas óticas desde su especificación en el epitelio ótico hasta las primeras fases de segregación de los ganglios coclear y vestibular. Este estudio se ha llevado a cabo mediante la caracterización de la expresión de los genes proneurales Neuro D y Neuro M, y su relación con la expresión de marcadores neuronales tempranos, TuJ-1, Islet 1/2, G4, y marcadores de diferenciación tardía, TrkC. Se ha determinado que los genes proneurales Neuro D y Neuro M están contribuyendo a la correcta delaminación y diferenciación de las neuronas cocleovestibulares, aunque no están implicados en la adquisición de identidad coclear o vestibular. Además se ha estudiado la implicación del IGF-I en este proceso, concluyéndose que este factor de crecimiento no parece ser necesario para la determinación temprana ni para la delaminación de los neuroblastos, aunque es fundamental para su supervivencia, induciendo su proliferación y diferenciación y protegiéndolos de la apoptosis.

Parte de los resultados de su tesis se han publicado en artículos y revisiones del grupo. Está en preparación un artículo más en el que se describen los patrones de expresión de los genes proneurales, Neuro D y Neuro M, y su relación con los marcadores de proliferación y supervivencia.

Durante la realización de su Tesis, Itziar Gorospe ha participado activamente en los seminarios bibliográficos y de trabajo del grupo. Asimismo ha realizado estancias cortas en centros de investigación en el marco de colaboraciones del grupo, lo que ha contribuido a mejorar su formación en biología del desarrollo. Creemos que su formación predoctoral es suficientemente sólida para dar el visto bueno a la presentación de su Tesis Doctoral.

Y para que así conste firmamos el presente documento en Madrid a 13 de octubre de 2005.

Fdo. Yolanda León Álvarez

Fdo. Isabel Varela-Nieto



Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

LA COMISION DE DOCTORADO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID,

INFORMA:

Que la MEMORIA "La neurogénesis del oído interno en aves: funciones del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I", presentada por la Licenciada D^a Itziar Gorospe Ugalde se ajusta a los criterios previamente establecidos por este Departamento.

Los resultados que presenta son originales, aportando nuevos datos sobre el tema y utilizando una metodología apropiada para el estudio del problema planteado. La bibliografía es completa y actualizada.

Por las razones expuestas esta Comisión informa favorablemente para la exposición y defensa pública de la citada memoria.

Madrid, a 27 de Octubre de 2005.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rafael Garesse Alarcón', is positioned above the typed name.

Fdo: Dr. Rafael Garesse Alarcón,
Director, Dpto. Bioquímica UAM

A mis padres, Jesús y Ángela
A mis hermanos, Iñigo y Ana
A Esther

Agradezco al Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza por la concesión de la beca de formación de personal científico para la realización de mi trabajo predoctoral. A la Dra. Isabel Varela-Nieto por dejarme formar parte del 2.11 y de tus proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) y del FIS, por la supervisión del trabajo durante todos estos años, por la ayuda económica y los esfuerzos personales necesarios para que esta tesis haya salido adelante. A la Dra. Yolanda León por tus correcciones, por tus sabias sugerencias, por todos y cada uno de los explantes que has sacado para ayudarme, por tu tiempo y tu dedicación incondicional. A las pedazo doctoras que salieron del 2.11 y con las que tuve el honor de trabajar Covi, Lupe y Susana, vosotras me enseñasteis con simpatía cuando no sabía ni coger una pipeta ¡qué paciencia la vuestra! A la Dra. Raquel Riquelme por tus consejos, por transmitir de una manera tan humana la experiencia de una científica, por tu autenticidad. Al Dr. Rafa Cediel y al Dr. Julio Contreras por mostrar siempre cercanía, por estar siempre dispuestos a echarme una mano cuando me perdía sobre todo en cuestiones de Adobe, os prometo que algún día me atreveré con el Corel.

Gracias a todas las personas que trabajan en los servicios comunes del IIB (CSIC-UAM) que hacen que la vida del becario sea más cómoda, lo cual no es ninguna tontería. Al servicio de imagen siempre tan amable con los que he vivido el avance de la tecnología ya que empezaron dándome los carretes de 35mm y terminaron enseñándome un programa de lo más sofisticado que trabaja sobre imágenes digitales. Al servicio de informática por vuestra infinita paciencia y sentido del humor que hace agradable cualquier visita a ese cuarto abarrotado de ordenadores y de buenas personas. A Lola, del servicio confocal, porque siempre tienes una solución para sacar favorecidos hasta los experimentos menos agraciados, por tener siempre ese carácter tan positivo y una buena conversación. También a la gente de los laboratorios vecinos especialmente a los del 2.10 siempre dispuestos a prestarme ese microlitro de última hora.

También agradecer al Dr. Domingos Henrique y al Dr. Markus Hartl en cuyos laboratorios me quité el miedo a trabajar en Biología Molecular. Al Dr. Fernando Giráldez y a la Dra. Berta Alsina por vuestra ayuda a lo largo de toda mi tesis, por compartir vuestro trabajo conmigo y por estar siempre dispuestos a hacerme un hueco en vuestro grupo cuya calidad científica y humana me han enseñado a disfrutar a tope de la ciencia. Cada vez que os he visitado me habéis hecho sentir una más y eso para mí ha sido muy importante. Al Dr. Enrique de la Rosa, a la Dra. Flora de Pablo y a las personas que con ellos trabajan por los seminarios que hemos compartido, para mí escucharos siempre ha significado aprender.

No me quiero olvidar de la gente con la que he trabajado codo con codo y que ya no están en el laboratorio, gracias a M^aÁngeles, Patricia, Susana, Amelia y Yolanda porque vosotras me habéis enseñado que en la vida hay muchas opciones y que poner fin a una etapa significa seguir hacia adelante. Y por supuesto, quiero agradecer a los que continúan en el 2.11 y aún no he nombrado. A Yoko, la jotera zaragozana más exótica, me he reído un montón con tus historias y nunca he dejado de admirar tu rigor y motivación en el trabajo. A Laura, Lauri, Lau ¡qué lujo de persona!, muchas gracias por no fallarme ni un sólo día durante todos estos años, no me acuerdo cuando pasaste de

compañera a persona imprescindible en mi vida, espero estar contigo y con Alberto hasta que terminéis de pagar la hipoteca y algún año más. Y como no, a Jose que hemos sido un "poco" de todo pero sobre todo tengo que decir que para mi has sido un descubrimiento, el mejor de toda mi tesis. Has conseguido sacar mi faceta más alegre, la más ridícula, la más cariñosa y porque no decirlo la más borde, me has enseñado a hacerme "supergracia" y hasta has introducido un amplio repertorio de expresiones en mi vocabulario. Has conseguido con nota el título de entrañable, gracias Jose. Agradezco al equipamiento 4 con los que he compartido tantas comidas, por ser el labo "donde todo el mundo conoce tu nombre". Al Dr. Miguel Manzanares por estar siempre dispuesto a hablar de tú a tú. A Eva por tu comprensión, a Carlos por tu inteligencia "loca" que consigue sonrojarme tan fácilmente, a Bárbara por tu simpatía que nunca se te olvida mostrar y por la disposición que siempre has tenido para ayudarme en lo que sea, para charlar un rato. A Miguel que apareciste como quien no quiere la cosa y te has convertido en la persona con la que me encanta compartir mis aficiones, espero que juntos hagamos muchos más kilómetros de los que ya hemos hecho. A Susana que ya te he nombrado como la Dra. que me enseñó a manejar en el labo pero no como mi amiga, con la que he hablado hasta quedarme ronca y me he reído hasta dolerme la tripa. A veces es a los más cercanos a los que se nos olvida agradecer las cosas así que por si se me olvida, gracias Su, por escucharme con sensatez. Sería imposible decidirme por una de tus cualidades así que si me lo permites me quedo contigo, entera. A Ricardo ese pedazo León, por tu apoyo constante y por compartir conmigo un montón de fines de semana en los que hemos "desfasado" yendo al cine, charlando de la vida, discutiendo hasta el cabreo, eres el borde más encantador que he conocido y por si alguna vez lo habías dudado, lo que más me gustaba de tu coche era el chofer. A Esther, nire pisukide maitea, te dedico la tesis junto con los que más aprecio porque creo que convivir contigo de la manera en que te implicas nos ha generado un vínculo sin nombre que espero que se mantenga.

Por último, a los que desde nire ama-lurra Euskal Herria me han apoyado. Aunque parezca paradójico estar lejos de casa sin teneros para querer volver una y otra vez para mí no hubiese sido posible. A mi "cuadrilla" Cristina, Olatz, las Arrates, Elena, Itziar y Amaia, por estar siempre dispuestas a organizar una cenica o un café para ponernos al día y echar unas risas, gracias por hacerme partícipe de todos vuestros logros. A mi familia, mi agradecimiento más especial, gracias a mi hermana por animarme, por no dejarme en ningún momento, por empujarme hacia arriba y dejarme aprender de tu experiencia, a mi hermano por tener la valentía de traer a la familia nuestra mayor alegría, Gaizka. Y como no a las personas más importantes de mi vida, a mi aita que me apoyaste en todo momento, tenías toda la razón cuando me decías que empresariales era una carrera más práctica. En los momentos en los que he flaqueado me he acordado de tu carácter luchador que espero haber heredado, y a mi ama, un ejemplo de mujer con mayúsculas, de madre de las que ya no se hacen. Gracias por tener siempre buenas palabras, telefónica tiene que estar encantada con nosotras. Sólo decirte que mi mayor orgullo sería parecerme a ti algún día.

Resumen

La generación de las neuronas óticas es un proceso secuencial que comienza con la especificación de sus precursores en el epitelio ótico. Estos precursores son neuroblastos epiteliales que delaminan de manera constante y secuencial de la vesícula ótica (OV) para formar el ganglio cócleo-vestibular (CVG). Los neuroblastos ganglionares proliferan y se diferencian en las neuronas que inervarán los órganos sensoriales cocleares y vestibulares. Para que se produzca este proceso de neurogénesis de manera adecuada es necesaria la participación de factores de crecimiento y de transcripción. En este trabajo se estudia la participación de los genes proneurales, Neuro D y Neuro M, y del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I (IGF-I) en la neurogénesis del CVG. Los resultados muestran que los patrones de expresión de ambos genes proneurales son similares y que la actividad del IGF-I endógeno, es esencial para la formación del CVG. El análisis de la proliferación celular, la muerte celular programada y la expresión de marcadores neuronales tempranos como Tuj-1, Islet 1/2, G4 y TrkC, indican que la expresión de Neuro D y Neuro M coincide con la expresión de marcadores de proliferación y precede a la de los marcadores de diferenciación como TrkC. Por otra parte, al contrario que Neuro D o Neuro M, el IGF-I no parece ser necesario para la determinación temprana ni para la delaminación de los neuroblastos pero es fundamental para la supervivencia celular. Su función es inducir la proliferación y diferenciación celulares y proteger a los neuroblastos de la apoptosis. Estos resultados sugieren que el IGF-I es un factor endógeno muy importante para el mantenimiento de la neurogénesis del CVG, facilitando la supervivencia y proliferación de la población de neuroblastos ganglionares y su tránsito a neuronas post-mitóticas mientras que los genes proneurales Neuro D y Neuro M contribuyen a la correcta delaminación y diferenciación de estas neuronas aunque no están implicados en la adquisición por parte de las neuronas del CVG de identidad coclear frente a la vestibular.

Abstract

Ear neurons are generated during early development in parallel with the formation of the otic vesicle. The generation of otic neurons is a sequential process that starts with the specification of otic precursors in the otic epithelium. The second visible output of otic neurogenesis is the delamination of epithelial neuroblasts from the otic vesicle to populate the cochleovestibular ganglion (CVG). The delamination is a constant and sequential process. The third event is the proliferative expansion of ganglionic neuroblasts and, finally, the differentiation of neurons that innervate back the vestibular and cochlear sensory organs. Each step is characterized by the expression of a particular set of transcription factors and growth factors. In this work, it has been studied the involvement of proneural genes, Neuro D and Neuro M, and the insulin-like growth factor-I (IGF-I) during the formation of the chick CVG. The results show that the expression patterns of both proneural genes are similar and that the endogenous IGF-I activity is essential for ganglion generation. Analysis of cell proliferation, cell death and expression of the early neuronal antigens Tuj-1, Islet 1/2, G4 and TrkC indicate that the expression of Neuro D and Neuro M is necessary in the delamination process, coincident with the expression of proliferation markers and also come first to the expression of differentiation markers. Furthermore, the IGF-I is not required for cell fate specification or delamination of epithelial neuroblasts but it is essential for cell survival. Its functions are the induction of cell proliferation, cell differentiation and it prevents the neuroblasts from apoptosis. These findings suggest that on the one hand, IGF-I is essential for neurogenesis by allowing the expansion of a transit-amplifying neuroblast population and its differentiation into postmitotic neurons, and on the other hand, the proneural genes Neuro D and Neuro M contribute to the proper delamination and differentiation of these neurons, although they are not implicated in the acquisition of the cochlear or vestibular identity.

ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	
1. El desarrollo del oído interno en vertebrados.....	2-3
1.1 Inducción de la placoda ótica y formación de la vesícula ótica.....	3-4
1.2 Morfogénesis: balance entre la proliferación celular y la muerte celular programada.....	4-6
2. Neurogénesis del ganglio cócleo-vestibular (CVG).....	6-7
2.1 Adquisición de la competencia neural.....	7-8
2.2 Delaminación de los neuroblastos epiteliales y proliferación.....	9
2.3 Diferenciación de los neuroblastos a neuronas funcionales.....	9-10
3. Factores implicados en la regulación de la neurogénesis.....	10
3.1 Factores de transcripción bHLH: la familia de NeuroD.....	10-12
3.2 Factores de crecimiento.....	
3.2.1 La familia de la Insulina (IGFs).....	13-14
3.2.2 Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs).....	14-15
3.3 La familia de las neurotrofinas y sus receptores.....	15-16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Extracción de embriones.....	18
2. Cultivos organotípicos de vesículas óticas.....	19
2.1 Detección de la incorporación de bromodeoxyuridina (BrdU).....	19-20

2.2 Extracción de ARN y <i>RetroTranscriptase Polimerase Chain Reaction</i>	20-21
3. Inmunohistoquímica.....	21
3.1 Inmunohistoquímica en secciones.....	21-22
3.2 Inmunohistoquímica doble.....	22
3.3 Inmunohistoquímica en explantes de vesículas óticas.....	22-23
4. Hibridación <i>in situ</i>.....	23
4.1 Hibridación <i>in situ</i> en embriones enteros.....	23-24
4.2 Hibridación <i>in situ</i> en secciones.....	24
4.3 Hibridación <i>in situ</i> en explantes de vesículas óticas.....	25
4.4 Hibridación <i>in situ</i> doble en secciones.....	25
4.5 Hibridación <i>in situ</i> seguida de inmunohistoquímica en secciones.....	26
5. Detección de la muerte celular por <i>Terminal Transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labelling</i> (TUNEL).....	26
6. Trazadores celulares: DII y DiO.....	26-27
7. Análisis estadístico y morfométrico de los resultados obtenidos en explantes de las vesículas óticas.....	27-28

RESULTADOS

1. Función del IGF-I endógeno en la formación del CVG.....	29
2. Descripción de la neurogénesis del CVG.....	29-30
2.1 Estudio de la delaminación de los neuroblastos que van a formar el CVG.....	30
2.2 Estudio del patrón de expresión de los genes proneurales durante el desarrollo del oído interno.....	30
2.2.1 La función de Neuro D y Neuro M en la especificación de la competencia neuronal del CVG.....	31-32

2.2.2 La función de NeuroD y NeuroM en la adquisición de la identidad coclear y vestibular.....	32-33
2.3 Estudio de la proliferación y la supervivencia celular.....	33-34
2.4 Estudio de la diferenciación de los neuroblastos inmaduros hacia neuronas funcionales.....	34-36
3. ¿Qué partes del proceso de la neurogénesis del ganglio cócleo-vestibular están moduladas por el IGF-I?.....	36
3.1 Implicación del IGF-I en la especificación de la competencia neuronal y la delaminación de los neuroblastos inmaduros.....	36-37
3.2 Implicación del IGF-I en la proliferación, la supervivencia celular y el mantenimiento del fenotipo neural.....	37-38
FIGURAS.....	39-52
DISCUSIÓN	
1. La neurogenesis del CVG es un proceso secuencial.....	53
1.1 La delaminación de los neuroblastos epiteliales es un proceso constante y secuencial.....	53-54
1.2 Genes relacionados con la adquisición de la competencia neural.....	54-55
1.3 La proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular.....	56-59
2. El IGF-I participa en la generación del ganglio cócleo-vestibular.....	59-60
3. Implicación del IGF-I en la neurogénesis del CVG.....	60-61
3.1 El IGF-I no parece estar implicado en la delaminación.....	61-62
3.2 El IGF-I está implicado en la proliferación, supervivencia y diferenciación de los neuroblastos.....	62-65
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67-73

ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxiribonucleico codificante
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Seroalbumina bovina
CVG	Ganglio cócleo-vestibular
DI	Delta
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HH	Estadio embrionario según la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951)
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
IGF1R	Receptor tipo 1 para los IGFs
IGFBP	Proteína de unión a IGF
IR	Receptor de la insulina
JB1	Péptido inhibidor del IGF-I
NBT	Nitroblue Tetrazolium
Ngn	Neurogenina
NGS	Suero de cabra
OV	Vesícula ótica
PBS	Tampón fosfato salino
PBT	PBS con 0,3% Triton
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PTW	PBS con 0,1% de Tween
SSC	Citrato sódico salino
SDS	Dodecil sulfato sódico
TUNEL	<i><u>T</u>erminal <u>T</u>ransferase mediated <u>d</u>UTP-biotin <u>N</u>ick <u>E</u>nd <u>L</u>abelling</i>
Trk	Receptor de neurotrofinas con actividad tirosina quinasa
zN	Zona neurogénica

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. El desarrollo del oído interno en vertebrados.

El oído adulto de los vertebrados es el órgano sensorial responsable de la audición, del equilibrio y de informar de la posición corporal. Se divide en tres regiones: el oído externo, el oído medio y el oído interno. El oído externo surge del primer par de arcos branquiales que se invaginan para formar la cavidad auditiva y es la región que capta los estímulos sonoros del exterior. El oído medio, separado del anterior por la membrana timpánica, se deriva de la primera bolsa faríngea y es donde se localiza una cadena de pequeños huesos que transforman las ondas sonoras en vibraciones mecánicas. Finalmente el oído interno, se forma a partir de un engrosamiento cefálico, la placoda ótica, y es donde se produce la transformación de la señal mecánica en la señal eléctrica que se interpretará en los centros auditivos del cerebro. El oído interno es una estructura muy elaborada, en la que se pueden distinguir morfológicamente tres zonas que distinguen dos áreas funcionales: una zona de conductos ortogonales llamados conductos semicirculares, donde se encuentran localizados los sentidos de la posición y el movimiento, este es el área vestibular. Una proyección ventral que es el conducto coclear, responsable de la audición, el área coclear. Una estructura que se proyecta dorsomedialmente, el conducto endolinfático, responsable de la absorción activa de la endolinfa. Las áreas sensoriales tienen células mecanoreceptoras similares, denominadas células ciliadas, que son las que transforman los impulsos mecánicos en señales eléctricas. En aves el órgano sensorial auditivo se denomina papila basilar, equivalente al órgano de Corti en mamíferos, y los órganos sensoriales vestibulares incluyen tres crestas ampulares localizadas en los canales semicirculares, dos máculas: utricular y sacular y una mácula neglecta en la lagena que corresponde a lo que en mamíferos se denomina cóclea. Estos órganos sensoriales se encuentran bañados por los fluidos segregados por las células secretoras. Las células ciliadas vestibulares están inervadas por neuronas sensoriales cuyos somas se encuentran en el ganglio vestibular, y cuyas proyecciones axonales se concentran en la rama vestibular del VIII par craneal y se proyectan hasta el núcleo vestibular que se sitúa en el tronco del encéfalo. De esta manera se conecta el oído interno con el sistema nervioso central. A su vez, el epitelio sensorial coclear está inervado por neuronas con los somas en el ganglio coclear, cuyas proyecciones se reúnen en la rama coclear del VIII par craneal y se proyectan hasta el núcleo coclear conectando el oído con el sistema nervioso central (Wu y Oh, 1996; Fekete y Wu, 2002; Rubel y Fritzsche, 2002).

El desarrollo del oído interno es un proceso de diversificación celular y distribución espacial que se ha conservado durante la evolución. A pesar de esto, existen algunas diferencias entre

las especies de vertebrados, sobre todo en la parte coclear. Así, los vertebrados acuáticos presentan esta parte reducida y su complejidad va aumentando según se avanza en la filogenia. Las aves presentan una parte coclear alargada denominada lagena y sólo la parte coclear de los mamíferos adquiere el enrollamiento típico en forma de caracol de la cóclea (Riley y Phillips, 2003).

El desarrollo del oído interno se puede dividir en una serie de procesos básicos que son: 1) la inducción de la placoda ótica; 2) la proliferación, morfogénesis y crecimiento de la vesícula ótica; 3) la neurogénesis del ganglio cócleo-vestibular (CVG) y 4) la diferenciación de los distintos tipos celulares. Simultáneamente a estos procesos y en regiones concretas se produce la muerte celular programada o apoptosis, de modo que el balance proliferación-muerte será el que determine la morfología y el número final de células que componen el órgano adulto (Figura 1).

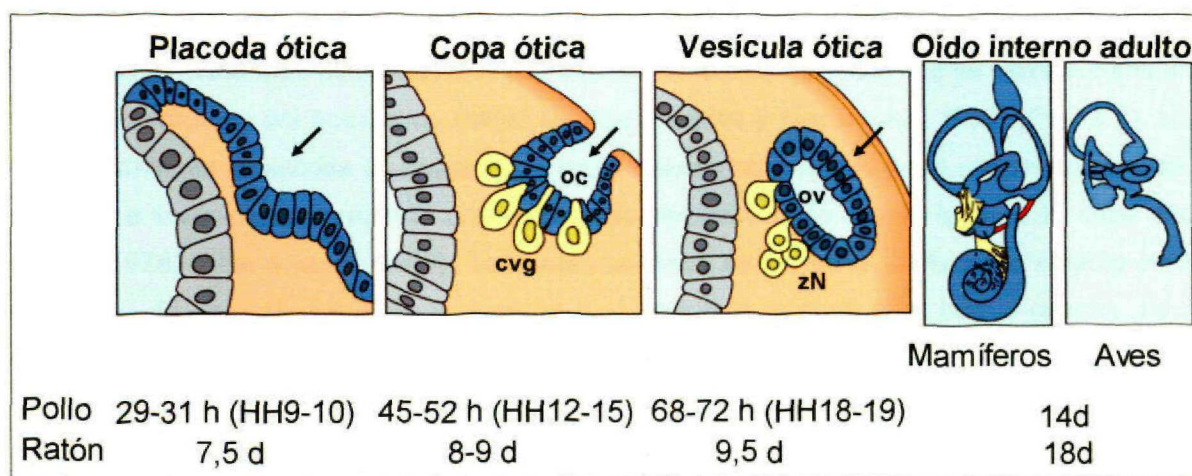


Figura 1. Esquema de las principales etapas en el desarrollo del oído interno. En la parte superior se muestra un esquema de las principales etapas del desarrollo del oído interno. En la parte inferior están indicados los estadios del desarrollo embrionario del pollo en los que transcurren estas etapas, desde la aparición de la placoda ótica en estadios HH9-10, fase de copa ótica entre los estadios HH12-15, formación de la vesícula ótica que se separa del ectodermo entre los estadios HH18-19 hasta la consecución del oído interno adulto que se forma en el día embrionario 14. También se muestra el oído interno adulto de mamíferos y un estudio comparado entre pollo y ratón. cvg, ganglio cócleo-vestibular; oc, copa ótica; ov, vesícula ótica; zN, zona neurogénica; HH, estadio embrionario según Hamburger y Hamilton (1951); h, horas; d, días embrionarios (Varela-Nieto y cols., 2004).

1.1 Inducción de la placoda ótica y formación de la vesícula ótica.

El desarrollo del oído interno comienza con un engrosamiento transitorio del ectodermo en la región romboencefálica a nivel de los rombómeros 5 y 6 cerca de la placa neural. Por experimentos de transplantes y por evidencias morfológicas y moleculares se demostró que el primer paso en el desarrollo del oído es la adquisición de la competencia placodial por parte del

ectodermo que rodea a la placa neural (Torres y Giraldez, 1998; Baker y Bronner-Fraser, 2001; Noramly y Grainger, 2002; Solomon y cols., 2004). Este proceso comienza al final de la gastrulación y al principio de la neurulación (Meier, 1978; Gallagher y cols., 1996; Groves y Bronner-Fraser, 2000). En estos primeros momentos, existen muchas señales inductivas procedentes de tejidos circundantes como el mesodermo paraxial, el tubo neural romboencefálico y el neuroectodermo. Unas de las señales más relevantes en este proceso son las desencadenadas por los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) (Torres y Giraldez, 1998; Phillips y cols., 2001; Maroon y cols., 2002; Wright y Mansour, 2003; Bok y cols., 2005). Además, los tejidos adyacentes al romboencéfalo son los encargados de generar las señales que proporcionan una correcta adquisición de la información respecto a los ejes posicionales antero-posterior y dorso-ventral del oído, aunque se desconoce con exactitud el momento en el que el tejido ótico adquiere esta información posicional (Wu y Oh, 1996; Fekete y Wu, 2002).

Gracias a todas estas señales inductivas el ectodermo ótico se convierte en una estructura separada del ectodermo circundante, la placoda ótica (Jacobson, 1963) que se percibe como una pequeña depresión del ectodermo dorsal cefálico (Alvarez y Navascues, 1990) (Figura 1). Una vez determinada la placoda se invagina, se mueve lateromedialmente y sus células comienzan a dividirse e invaginarse formando un epitelio pseudoestratificado dando lugar a la copa ótica (Meier, 1978; Hilfer y cols., 1989). Todo esto se hace visible en el pollo en el estadio HH12 (Figura 1). El poro ótico que es la apertura que comunica la copa ótica con el exterior, se va cerrando poco a poco hasta que en el estadio HH18 se completa dicho cierre formándose la vesícula ótica u otocisto (Marovitz y cols., 1977; Represa y cols., 1990; Brigande y cols., 2000). La vesícula ótica muestra autonomía respecto a los tejidos y estructuras adyacentes de manera que puede ser explantada del embrión a un medio de cultivo definido y desarrollarse normalmente generando los patrones, la diversidad celular y la morfogénesis de forma semejante a la que hubiese generado de estar en su entorno normal (Leon y cols., 1995; Leon y cols., 1999).

1.2 Morfogénesis: balance entre la proliferación celular y la muerte celular programada.

La morfogénesis del oído interno es un proceso complejo durante el cual es fundamental mantener un balance entre la muerte y la división celular. Durante el proceso de desarrollo del oído interno se produce muerte celular programada en zonas concretas que se conservan en distintas especies (Represa y cols., 1990; Sanz y cols., 1999a Lang y cols., 2000; Varela-Nieto y cols., 2003; Leon y cols., 2004)

En pollo se ha descrito la presencia de áreas de muerte celular durante la morfogénesis del oído interno, asociadas con la formación de la OV y del CVG. Durante la formación de la vesícula ótica (HH14-19) se han encontrado focos de muerte celular programada durante el cierre de la copa ótica, en la zona del poro ótico, relacionadas con la separación de la vesícula ótica del ectodermo adyacente (Figura 2, I y II). También se ha identificado una pequeña región de células apoptóticas en la pared ventromedial del epitelio ótico, coincidiendo temporal y espacialmente con la zona neurogénica y el CVG (Lang y cols., 2000; Leon y cols., 2004). En cuanto a la proliferación es uniforme en todo el epitelio de la copa ótica momentos antes del cierre de la misma (HH13-HH15). En el momento del cierre del poro ótico (HH16-HH18) la proliferación disminuye en el poro ótico y en la pared dorsolateral de la vesícula, donde precisamente aparece la muerte celular programada.

En el comienzo de los procesos de morfogénesis y diferenciación del oído interno, desde el estadio HH19 hasta HH23, la mayor proliferación celular se localiza en la pared ventromedial de la vesícula ótica que incluye una parte medial más cercana al CVG de menor proliferación y mayor muerte celular. En el estadio HH23 la máxima proliferación se observa en el conducto endolinfático y en la pared dorsal. En este estadio, en el que el conducto coclear comienza a elongarse, la apoptosis persiste en la pared ventromedial y se observa un segundo foco en la zona donde se está formando el conducto endolinfático (Figura 2, I).

Durante la formación de los canales semicirculares continúa la proliferación en las partes anterior y posterior de la vesícula ótica, en la pared medial del conducto coclear y en las zonas distales de los canales semicirculares, mientras que la muerte se localiza ahora en varios focos: en la región ventromedial, en la base del conducto endolinfático y en las tres regiones donde se están produciendo los cierres de los canales semicirculares que se forman como evaginaciones del epitelio del otocisto que tienen que fusionarse para su correcta formación (Figura 2, I).

En cuanto al CVG, existe proliferación celular desde HH13-29 aunque su localización no es uniforme. Entre los estadios HH21 y HH29 coexisten células apoptóticas y células proliferando. En el estadio HH25, cuando los ganglios se segregan en coclear y vestibular por elongación del conducto coclear, se observan más células proliferativas en la parte vestibular que en la coclear. Se ha visto que en el ganglio coclear de pollo la división celular, a diferencia del ratón, cesa desde la parte distal del ganglio a la proximal (D'Amico-Martel, 1982; Lang y cols., 2000; Rubel y Fritsch, 2002). En el estadio HH28 persiste la muerte celular en el ganglio coclear a pesar de que la mayoría de las células ganglionares han dejado de proliferar y las células ciliadas ya están diferenciándose (Figura 2, I). En ratón, esta apoptosis se ha explicado como una evidencia de que la muerte celular acompaña a la sinaptogénesis (Knipper y cols., 1999).

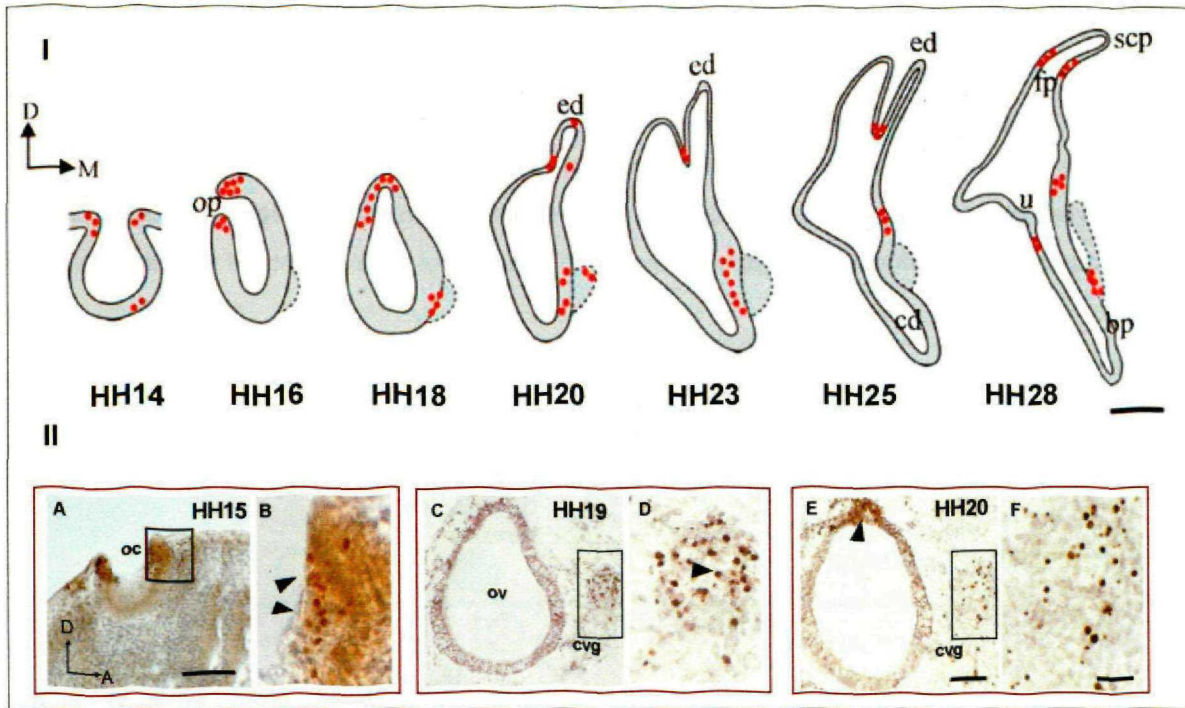


Figura 2. Muerte celular programada durante el desarrollo del oído interno. En la parte superior se muestran dibujos de secciones mediales de embriones de pollo mostrando áreas apoptóticas (puntos rojos) desde el estadio de copa ótica HH14 hasta HH28. En la parte inferior se muestran microfotografías de la distribución de células apoptóticas, determinada por la técnica de TUNEL, sobre secciones de 25 μ m de grosor obtenidas de los embriones de los estadios indicados en cada panel (A-F). Las puntas de flechas apuntan a las células apoptóticas. B, D y E son ampliaciones de las panorámicas generales que se encuentran a su izquierda. Barra en I, 100 μ m(HH14-20), 120 μ m(HH23), 130 μ m(HH25), 200 μ m(HH28); A, C y E, 100 μ m; B, D y F, 50 μ m; oc, copa ótica; ov, vesícula ótica; cvg, ganglio cócleo-vestibular; ed, conducto endolinfático; fp, placas de fusión; op, poro ótico; u, utrículo; cd, conducto coclear, scp, bolsa del canal superior; bp, papila basilar (Leon y cols., 2004).

2. Neurogénesis del ganglio cócleo-vestibular.

La neurogénesis es el proceso por el cual las células nerviosas se generan y se organizan para formar el sistema nervioso de los animales. En el oído comienza cuando determinadas células del epitelio ótico especifican su destino neuronal y se distinguen de las células no neurogénicas. Continúa con la delaminación de estos precursores óticos del epitelio ótico para formar el CVG, y sigue con la proliferación y la expansión de los neuroblastos que finalmente se diferencian a neuronas que inervan los órganos sensoriales cocleares y vestibulares. En la Figura 3 se representa de manera esquemática cómo podría ser la neurogénesis ótica. Una parte de dicho esquema es lo que se irá estudiando a lo largo de este trabajo.

La formación del CVG ocurre de forma paralela a la formación de la vesícula ótica. Se origina como una unidad y genera dos ganglios: el coclear y el vestibular. A diferencia de otros ganglios craneales, cuyas neuronas tienen un doble origen, ya que provienen de la placoda y de la cresta

neural, el CVG se compone de neuronas cuyo origen es exclusivamente la placoda ótica (Yaneza y cols., 2002).

El origen de las células del CVG que no son neuronas es controvertido y se han propuesto al menos tres orígenes: la parte proximal del ganglio facial (Von Bartheld, 1990), el tubo neural contribuyendo además a la formación de la vesícula ótica (Ali y cols., 2003) y la cresta neural (D'Amico-Martel y Noden, 1983; Noden, 1983), siendo esta última la hipótesis más aceptada.

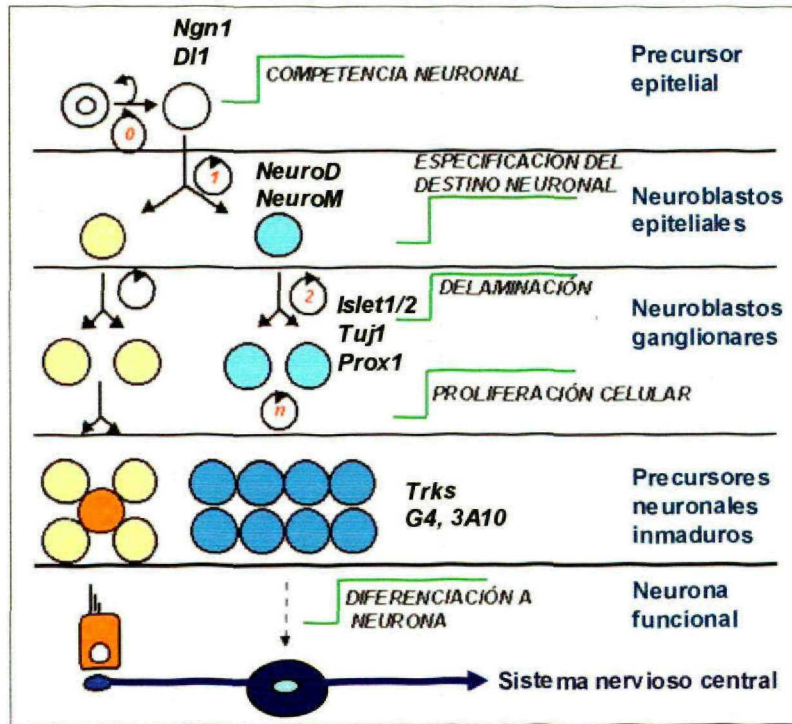


Figura 3. Esquema hipotético de la neurogénesis del CVG. Esquema de la especificación progresiva de las células desde la delaminación de la vesícula ótica hasta llegar a ser neuronas funcionales. A la izquierda se representan las divisiones celulares que se producen marcando en amarillo aquellas células cuyo destino será llegar a ser células ciliadas y en azul las que finalmente serán neuronas funcionales. Los genes neuronales que se expresan a lo largo de este proceso están en negrita. A la derecha, en cursiva figuran los procesos que tienen lugar en cada fase y en azul los distintos tipos celulares que se van originando, comenzando con un precursor epitelial en el epitelio ótico que da lugar a los neuroblastos epiteliales que continúan en el epitelio ótico y que una vez que delaminan, en el CVG se denominan neuroblastos ganglionares y tienen capacidad proliferativa, cuando la pierden y comienzan a expresar marcadores como Trks, G4 y 3A10 se denominan precursores neuronales inmaduros que terminan convirtiéndose en neuronas funcionales (Alsina y cols., 2003).

2.1 Adquisición de la competencia neural.

Los estudios realizados en *Drosophila melanogaster* han ayudado a comprender las bases moleculares de la adquisición de la competencia neural (Campuzano y Modolell, 1992). En *D.melanogaster* los genes más importantes para la adquisición de competencia neural son los

de la familia *achaete-scute* (*asc*) y *atonal* (*ato*). Se expresan en grupos definidos de células y pueden actuar en la determinación del destino neuronal, la diferenciación celular o la identidad neuronal, aunque pertenezcan a la misma familia. Sin embargo, los genes proneurales de los vertebrados poseen cada cual funciones diferentes que pueden ser cooperativas, sinérgicas o redundantes estando regulados de manera muy precisa por señales extracelulares y factores difusibles (Bertrand y cols., 2002).

En los vertebrados se han descrito los genes de la familia neurogenina y Neuro D para la adquisición de la competencia neural (Bertrand y cols., 2002). La adquisición de la competencia neural en el oído interno de aves comienza en el estadio de placoda ótica, donde se ha propuesto la existencia de un dominio presuntamente neuro-sensorial, la zona neurogénica (zN), de donde surgirán tanto las futuras neuronas óticas como las células sensoriales (Fekete y Wu, 2002; Satoh y Fekete, 2005). Suponiendo la existencia de un precursor epitelial multipotente, la especificación neuronal comienza con la expresión de los genes neurogénicos *Ngn1* y *Delta1*. Estos genes se expresan hasta los estadios de formación de la OV en los neuroblastos epiteliales y no en los ganglionares (Figura 3) (Adam y cols., 1998; Abu-Elmagd y cols., 2001). La expresión de *DI1* provoca la inhibición lateral por la unión de este con el receptor Notch de las células vecinas, inhibiendo la expresión de genes proneurales y evitando la adquisición de la competencia neural. Esta inhibición lateral se produce tanto en vertebrados como en invertebrados de manera muy similar (Bertrand y cols., 2002; Alsina y cols., 2003). Además la expresión de estos genes neurogénicos está precedida por la expresión de FGF10 que actúa como una señal inductora reguladora de estos eventos iniciales (Alsina y cols., 2004).

Una vez que se ha adquirido la competencia neural, en aves, comienzan a expresarse otros genes proneurales como NeuroD y NeuroM, que son los que se estudian en esta tesis, y otros factores como Prox1 (Stone y cols., 2003) en los denominados neuroblastos epiteliales. Esta expresión comienza en los estadios de copa ótica y continúa en los neuroblastos epiteliales y en los ganglionares. Se desconoce si es en este momento cuando se produce la especificación del destino de las neuronas cocleares y vestibulares o si esta se produce una vez han delaminado. En ratones se ha propuesto la existencia de dos zonas progenitoras independientes para neuronas cocleares y vestibulares en el epitelio ótico, que vienen determinadas por la expresión diferencial de GATA-3 y NeuroD (Lawoko-Kerali y cols., 2004). Sin embargo, los trabajos en pollo no han podido demostrar esta separación en el epitelio y han aportado evidencias de que esta compartimentación no es tan clara (Lang y cols., 2000; Fekete y Wu, 2002; Chae y cols., 2004; Satoh y Fekete, 2005). Por tanto, no existen pruebas precisas de que en los neuroblastos epiteliales de pollo exista ya la identidad coclear frente a vestibular.

2.2 Delaminación de los neuroblastos epiteliales y proliferación.

En el pollo, la formación del CVG comienza con la delaminación de los neuroblastos epiteliales en el estadio de copa ótica, HH12-13, desde un subdominio concreto de la zona anteroventral del epitelio ótico (Figura 1) (Hemond y Morest, 1991; Adam y cols., 1998). En ratón los neuroblastos delaminan de la misma zona pero de una parte más rostrolateral (Carney y Couve, 1989).

En el pollo, las células alcanzan su nivel migratorio máximo en los estadios HH16-17 continuando la migración hasta el estadio HH21 (D'Amico-Martel, 1982; Hemond y Morest, 1991). Además de migrar, los neuroblastos que forman la parte vestibular proliferan hasta el día embrionario 5 (HH26), a diferencia de los de la porción del ganglio coclear que continúan proliferando hasta el día 7 (HH31) (Rubel y Fritsch, 2002).

Según se van concentrando en el CVG los neuroblastos comienzan a expresar de manera secuencial Islet 1/2, de la familia de las proteínas con homeodominio LIM (Adam y cols., 1998; Li y cols., 2004), β -tubulina III (Tuj1) (Memberg y Hall, 1995) y marcadores de proliferación como: el antígeno neuronal de proliferación celular (PCNA) y la histona 3 fosforilada en serina 10 (PH3). La expresión de estos marcadores en pollo forma parte de este trabajo. El patrón espacio-temporal de proliferación de los neuroblastos del ganglio coclear muestra diferencias entre especies. Mientras que el gradiente de proliferación de las neuronas cocleares en el ratón va desde E11,5-E16 desde la parte distal a la proximal, en el pollo transcurre desde E3-4 (HH21) hasta E7 (HH31) desde la parte proximal hasta la distal (Rubel y Fritsch, 2002). En paralelo se produce el reajuste del número de neuronas, eliminándose mediante muerte celular programada las que no van a participar en las sinapsis (Ard y cols., 1985).

2.3 Diferenciación de los neuroblastos a neuronas funcionales.

Los neuroblastos ganglionares comienzan su diferenciación hacia precursores neuronales inmaduros y posteriormente a neuronas maduras funcionales. Los neuroblastos postmitóticos expresan marcadores relacionados con la extensión de neuritas y la supervivencia de éstas como son G4, 3A10 y TrkB/TrkC (Pirvola y cols., 1997; Sanchez-Calderon y cols., 2004). Pero en ratón se ha visto que no completan su diferenciación hasta que no se generan las corrientes iónicas, los receptores sinápticos y los neurotransmisores necesarios para la plena funcionalidad neuronal (Schimmang y cols., 1997).

En el pollo, como también ocurre en el ratón, las neuronas vestibulares maduran antes que las cocleares. El proceso final de diferenciación en las neuronas vestibulares ocurre entre los días 4 y 5 de desarrollo cuando los axones de estas neuronas comienzan a proyectar hacia el

epitelio ótico. La innervación coclear no comienza hasta el día 6 (HH28-29), a la vez que maduran las células ciliadas y las primeras sinapsis no se forman hasta los días 8 y 9 (HH34-35), estando ya organizadas a partir del día 15 (Whitehead y Morest, 1985; Hemond y Morest, 1991). Al mismo tiempo las neuronas del CVG contactan sinápticamente con los núcleos cocleares y vestibulares del tronco del encéfalo. El reajuste final del número de neuronas se produce entre los días 8 y 14, eliminándose aquellas neuronas cocleares y vestibulares que no van a establecer conexiones sinápticas (Ard y cols., 1985).

3. Factores implicados en la regulación de la neurogénesis.

El número final de neuronas que forman parte del oído interno y su correcto desarrollo depende de la coordinación de los procesos de proliferación, neurogénesis, diferenciación y muerte celular programada. El balance entre los diferentes eventos viene modulado por factores transcripcionales y de crecimiento.

3.1 Factores de transcripción bHLH: la familia NeuroD

La familia NeuroD comprende factores de transcripción bHLH que se caracterizan por su estructura de hélice-lazo-hélice. Controlan la determinación y la diferenciación de una variedad de tipos celulares a lo largo del desarrollo embrionario (Bertrand y cols., 2002). Los primeros factores bHLH, descritos en *D.melanogaster*, fueron los complejos *achaete-scute (asc)* y el *atonal* (García-Bellido y Moscoso Del Pradio, 1979; Campos-Ortega, 1995). Sus homólogos en vertebrados se describieron como participantes de la neurogénesis del tubo neural y se dividieron en dos grupos según su estructura: los relacionados con *asc* (*Mash*, *Cash*, *Zash* y *Xash*) y los relacionados con *atonal* que fueron a su vez divididos en subfamilias según la similitud de la secuencia de aminoácidos diana a la que se unen (*Math*, *Neurogenina*, *NeuroD* y *Olig*) (Lee, 1997; Tomita y cols., 2000; Bertrand y cols., 2002). Las funciones de estos homólogos en vertebrados son las mismas que en invertebrados, esto es, regular los procesos de neurogénesis, coordinar la adquisición del destino neuronal y cooperar en la determinación de la identidad de determinados subtipos neuronales. Estas proteínas bHLH forman heterodímeros con las proteínas denominadas proteínas E, formando complejos que reconocen en el promotor del gen diana una secuencia consenso hexamérica denominada caja E a la que se unen activando su expresión. Existen proteínas inhibidoras que forman un complejo con las proteínas E impidiendo la unión a las proteínas bHLH y por lo tanto su activación (Sasai y cols., 1992; Ishibashi y cols., 1994).

En las neuronas sensoriales craneales y en el epitelio sensorial olfativo la expresión de *Ngn1* precede a la de *NeuroD* y esta a la de *NeuroM*, de modo que actúan secuencialmente promoviendo la diferenciación neuronal (Roztocil y cols., 1997; Fode y cols., 1998; Ma y cols., 1998; Cau y cols., 2002). Además se ha propuesto que la activación de *NeuroD* por *Ngn* es directa produciéndose la unión a su promotor (Huang y cols., 2000).

Aquellos factores bHLH que se expresan en neuronas postmitóticas promueven la salida del ciclo celular y por lo tanto el inicio de la diferenciación. Lo hacen mediante la activación de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) como p16, p21 o p27 (Mutoh y cols., 1998). Pero en ocasiones la salida del ciclo celular no es tan inmediata, así por ejemplo, la expresión de *NeuroM* en la medula espinal y en el *tectum* óptico define un estado de transición entre los neuroblastos premigratorios indiferenciados y los precursores migratorios diferenciados postmitóticos (Roztocil y cols., 1997).

Además de sus funciones estrictamente neurogénicas o proneurales, en estadios más avanzados del desarrollo adquieren otras funciones dependiendo del contexto en el que actúen. Por ejemplo, en la generación de distintos tipos celulares en la retina si *NeuroD* y *NeuroM* se co-expresan con *Chx10* se inducen células amacrinas mientras que, si la co-expresión es con *Pax6* se generan neuronas bipolares (Hatakeyama y cols., 2001; Inoue y cols., 2001). Otro ejemplo se da en la especificación de motoneuronas en la que es necesaria la interacción de *Ngn2* y *NeuroM* con proteínas con homeodominio LIM: *Isl1* y *Lhx3* (Lee y Pfaff, 2003).

En la tabla 1 se describen las anomalías que presentan los ratones deficientes en *NeuroD* y *NeuroM*. Muestran alteraciones en los ganglios coclear y vestibular debidas a un incremento en la apoptosis neural causada por una delaminación aberrante de los neuroblastos (Liu y cols., 2000; Kim y cols., 2001).

Tabla 1. Alteraciones en ratones asociadas con mutaciones en genes implicados en la neurogénesis.

Genes	Alteraciones descritas	Bibliografía
<i>NeuroD</i>	Muerte temprana por diabetes neonatal. Pérdida casi total de las neuronas del oído interno: desaparecen el 80% de las neuronas en el ganglio vestibular y más del 95% en el coclear. Acortamiento de la cóclea, morfología del laberinto aparentemente normal, defectos en la innervación del órgano de Corti, ausencia de la expresión de TrkC y disminución de la expresión de TrkB en el CVG. Completamente sordos y con problemas de coordinación y equilibrio.	Liu y cols., 2000; Kim y cols., 2001
<i>NeuroM (Math3)</i>	Crecimiento retardado, defectos motores severos con ataxias múltiples causadas por defectos en la supervivencia celular. Reducción del cerebelo y pérdida parcial de las neuronas granulares del cerebelo. No se han estudiado los efectos en el oído interno.	Tomita y cols., 2000
<i>NeuroD/NeuroM</i>	Mueren temprano al nacer por las mismas causas que el mutante sencillo <i>NeuroD</i> . Ausencia de células amacrinas de la retina, aumento en el número de células ganglionares y gliales de Müller. No presentan un fenotipo adicional en el oído interno respecto al nulo <i>NeuroD</i> .	Liu y cols., 2000; Tomita y cols., 2000; Kim y cols., 2001; Inoue y cols., 2002
<i>Igf-1</i>	Muerte temprana, retraso en el crecimiento, tamaño del cerebro reducido, pérdida selectiva de poblaciones neuronales, hipomielinización, reducción de la velocidad de conducción de los nervios periféricos. Innervación anormal del órgano de Corti por verse afectada la supervivencia, diferenciación y maduración de las neuronas cocleares. Mielinización reducida en el nervio VIII y en los ganglios coclear y vestibular.	Liu y cols., 1993; Powell-Braxton y cols., 1993; Liu y cols., 1998; Camarero y cols., 2001 y 2002
<i>TrkB</i>	Alta tasa de mortalidad temprana, reducción en el número de neuronas sensoriales. Reducción del 60% de las neuronas motoras-faciales. Aumento de 3-4 veces los niveles apoptóticos de las neuronas del ganglio trigémino. Alteraciones en la arborización dendrítica de las neuronas piramidales, severa pérdida neuronal. Pérdida de la mayoría de las neuronas vestibulares y las cocleares de tipo 2	Klein y cols., 1994; Pinon y Linden, 1996; Frittsch y cols., 1997
<i>TrkC</i>	Muerte temprana, alteración de la conducta motora, pérdida del 20% de las neuronas de los ganglios de raíz dorsal. Aumento en los niveles de apoptosis en el ganglio trigémino (2 veces más que en ratones normales) Pérdida del 30% de las neuronas sensoriales. Pérdida de un subgrupo de neuronas vestibulares y de las neuronas cocleares de tipo 1.	Frittsch y cols., 1997; Silos-Santiago y cols., 1997
<i>TrkB/TrkC</i>	Reducción del 70% en el volumen del ganglio coclear y vestibular debida a la pérdida neuronal, disminución del 50% en el tamaño del núcleo coclear. Atrofia del órgano de Corti	Schimmang y cols., 1997

3.2 Factores de crecimiento.

3.2.1 La familia de la Insulina

Los miembros de la familia de la insulina son proteínas estructuralmente relacionadas y altamente conservadas a lo largo de la evolución (Figura 4). Están presentes durante el desarrollo embrionario y el crecimiento postnatal en la mayoría de las especies animales (Bondy y cols., 1990; revisado en Varela-Nieto y cols., 2004). Son moléculas multifuncionales de señalización que afectan a la proliferación celular, a la diferenciación, al metabolismo y a la supervivencia de muchos tipos celulares actuando tanto de modo autocrino como paracrino (De Pablo y De La Rosa, 1995; Jones y Clemmons, 1995; revisado en Varela-Nieto y cols., 2004).

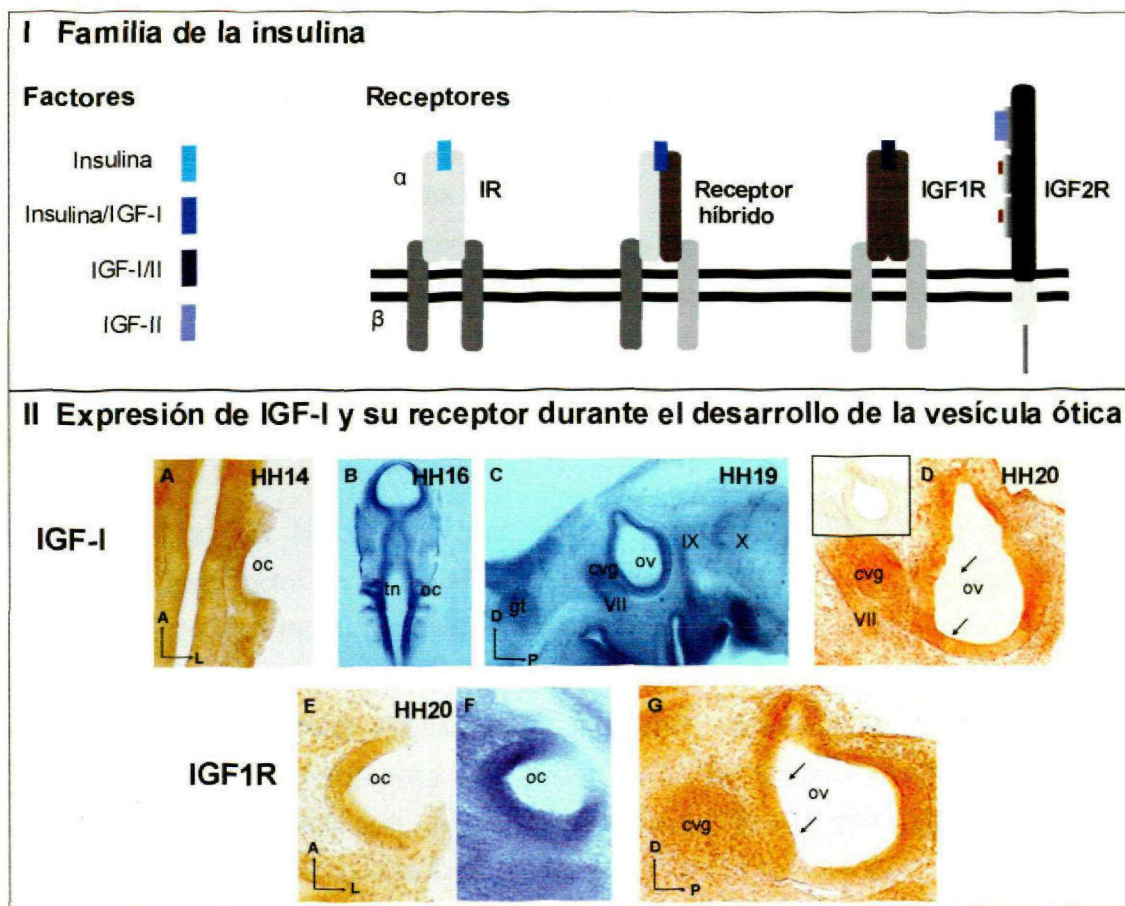


Figura 4. I Familia de la Insulina. Se representa mediante rectángulos los factores que pertenecen a la familia así como los distintos receptores a los que se unen los factores. **II Expresión de IGF-I e IGF1R en la vesícula ótica y el CVG de pollo.** La expresión del factor IGF-I y de su receptor de alta afinidad (IGF1R), a nivel de proteína (A, D, E y G) mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-IGF-I y anti-IGF1R y a nivel de ARNm (B, C y F) mediante hibridación *in situ* con sondas antisentido de IGF-I (B y C) e IGF1R (F). oc, copa ótica; ov, vesícula ótica; cvg, ganglio cócleo-vestibular; gt, ganglio trigémino; tn, tubo neural; VII, IX, X pares craneales; A, anterior; L, lateral; D, dorsal; P, posterior (Camarero y cols., 2003; Varela-Nieto y cols., 2004).

Los principales miembros de la familia son la insulina, su precursor la proinsulina, y los factores de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II). La familia IGF se completa con los receptores y las proteínas de unión de IGFs (IGFBPs), que actúan facilitando las funciones de los factores de la familia y su adecuada unión a los receptores. Existen distintos tipos de receptores que incluyen los de actividad tirosina quinasa, el receptor de alta afinidad por la insulina (IR) y el de alta afinidad por el IGF-I (IGF1R). Estos son receptores heterotetraméricos con dos subunidades extracelulares α de unión al factor y dos transmembranales β con actividad tirosina quinasa (Holzenberger y Lapointe, 2000; Nakae y cols., 2001; revisado en Varela-Nieto y cols., 2004). Existe también un receptor híbrido formado por la unión de un dímero IR α/β y un dímero IGF1R α/β (Baillyes y cols., 1997). Por otra parte, está el receptor tipo 2 que carece de actividad tirosina quinasa, es un receptor monomérico que une manosa-6-fosfato y que se encarga principalmente de controlar los niveles de los IGFs en el medio (Figura 4, I).

Tanto el factor como el receptor de alta afinidad (IGF1R) se expresan desde estadios tempranos en el desarrollo del oído interno. La expresión de ambos en el epitelio ótico y en el ganglio cócleovestibular es homogénea (Figura 4, II).

La acción de los IGFs comienza con la unión a sus receptores activando de esta manera las cascadas de fosforilación que afectan a múltiples sustratos intracelulares. En el oído de aves una de estas vías intrínsecas es la cascada Raf/MAPK asociada con la proliferación celular (Leon y cols., 1998; Sanz y cols., 1999; Sanz y cols., 1999) junto con la vía de Akt que promueve la supervivencia celular u otras que modulan los niveles de lípidos antiapoptóticos (Frago y cols., 2003).

Estudios en ratones *knock out* y transgénicos para *Igf-1* (Tabla 1) han demostrado la importancia de este factor en el desarrollo del sistema nervioso. El ratón deficiente en *Igf-1* muere a los pocos días de su nacimiento, presenta un crecimiento retardado, un cerebro más pequeño, hipomielinización y alteraciones importantes en la cóclea, que es de menor tamaño que lo normal y tiene una reducción significativa en el número y tamaño de las neuronas del ganglio auditivo (Liu y cols., 1998; Camarero y cols., 2001 y 2002). En humanos se sabe que la mutación en el gen *IGF-1* está asociada con sordera neurosensorial (Woods y cols., 1996; Woods y cols., 1997; Bonapace y cols., 2003). Estudios *in vitro* en explantes de vesículas óticas de pollo han demostrado que el IGF-I está implicado en la proliferación y supervivencia celular (Frago y cols., 1998; Sanz y cols., 1999b; Frago y cols., 2003).

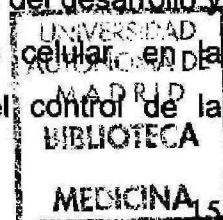
3.2.2 La familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y sus receptores componen una familia con diversas funciones en el desarrollo embrionario y durante la vida del organismo adulto. Se han descrito hasta 23 factores diferentes y 4 receptores a los que se unen estos factores para activar diferentes vías (Ornitz y Itoh, 2001; Ridyard y Robbins, 2003). Tienen un papel crítico en los procesos de inducción neural, en el establecimiento de los ejes posicionales en estadios tempranos, en la migración celular, en la proliferación y en la supervivencia (Henrique y cols., 1997; Cole y cols., 2000; Raballo y cols., 2000; Wilson y Edlund, 2001). Sus funciones principales son mitogénicas.

Entre los miembros de esta amplia familia, los que se han relacionado con distintos momentos de la neurogénesis en el oído interno son: FGF2, FGF8, FGF10 y FGF19. FGF2 se expresa en la placoda ótica y en la vesícula ótica, su sobreexpresión junto con FGF8 producen una extensión del CVG (Adamska y cols., 2001). FGF8 se expresa en la parte antero medial y posterior medial de la placoda ótica de manera complementaria a genes responsables de la inducción de la especificación del territorio ótico y la formación del oído interno. Los patrones de expresión de FGF8 sugieren su participación en la migración de los neuroblastos y en la invasión temprana que da comienzo después de la diferenciación de las neuronas (Hidalgo-Sanchez y cols., 2000; Sanchez-Calderon y cols., 2004). El FGF19 en el embrión de pollo proviene del mesodermo e induce señales que se expresan en el ectodermo neural, como Wnt8c y FGF8, que son imprescindibles para la neurogénesis del CVG (Ladher y cols., 2005). El FGF10 tiene un dominio de expresión temprana en la placoda ótica, anterior a la definición total de la región con competencia neuro-sensorial y por tanto anterior al inicio de la expresión de los genes proneurales *Ngn1*, *NeuroD* y *NeuroM*. Regula la expresión adecuada de estos genes convirtiéndose en pieza fundamental en la determinación del destino neuronal (Alsina y cols., 2004).

3.3 La familia de las neurotrofinas y sus receptores.

En mamíferos existen cuatro neurotrofinas caracterizadas: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4 (NT-4/5). En un principio se consideran fundamentales para el mantenimiento de las interacciones entre las neuronas y sus dianas durante el desarrollo embrionario. Posteriormente se comprobó que estaban además implicadas en otros procesos del desarrollo y la función neuronal. Son importantes en la toma de decisión del destino celular, en la supervivencia y en la diferenciación neuronal, en el crecimiento axonal, el control de la



orientación quimiotrópica de las neuritas, la arborización dendrítica, la función sináptica y la plasticidad neural (Lewin y Barde, 1996; Fritzsche y cols., 2004). Las neurotrofinas actúan a través de su unión a receptores de alta afinidad que tienen actividad tirosina quinasa y se denominan Trks (TrkA que une NGF, TrkB que une BDNF y NT-4/5, TrkC que une NT-3). Existe también un receptor de baja afinidad, el receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR) que tiene la misma afinidad por cualquiera de las neurotrofinas y que modula tanto la supervivencia como la muerte celular (Barrett, 2000; Lee y cols., 2001; Chao y Bothwell, 2002).

Tanto los receptores como los factores se expresan temprano en el desarrollo del oído interno de ratón y pollo. Mediante estudios *in vitro* sobre cultivos primarios de neuronas ó sobre cultivos organotípicos de explantes de CVG se ha comprobado que uno de los primeros indicios de identidad coclear frente a vestibular es la dependencia preferencial de las neuronas de cada parte del CVG por una de las neurotrofinas (Represa y cols., 1991; Fritzsche y cols., 1997; Pirvola y cols., 1997; Fritzsche y cols., 2002). Estas observaciones se confirmaron con el estudio de los ratones *knock out* sencillos y dobles para los receptores TrkC y TrkB que se discuten en la tabla 1.

Una de las funciones del NGF durante el desarrollo del sistema nervioso y su maduración es la de ser un inductor de la apoptosis. En zonas determinadas del CVG y de la vesícula ótica induce muerte celular a través del receptor p75NTR (Frago y cols., 1998 y 2003). Sin embargo, su receptor de alta afinidad es TrkA y se ha visto que esta unión ejerce la función de proteger las poblaciones neuronales (Cochran y cols., 1999).

Objetivos

OBJETIVOS

La ontogenia del oído interno en aves, en la que, entre otros procesos, tienen lugar la formación y la neurogénesis del CVG, es un modelo interesante para analizar este proceso secuencial y alguno de los factores que en él están implicados. Estudios previos e *in vitro* señalan a los factores de transcripción bHLH y al factor de crecimiento IGF-I como factores fundamentales en la adquisición de la competencia neural y el desarrollo del oído interno respectivamente. El propósito de esta tesis ha sido la caracterización de los factores de transcripción NeuroD y NeuroM en la neurogénesis del CVG y la implicación del factor IGF-I tanto en la formación como en la neurogénesis temprana. Para ello los objetivos que se plantearon fueron los siguientes:

1. Estudiar en explantes de vesículas óticas la acción del IGF-I endógeno en la generación del CVG.
2. Estudiar la delaminación de los neuroblastos epiteliales hacia el CVG mediante la administración de trazadores celulares que permiten ver dónde se sitúan espacialmente los neuroblastos que forman el CVG.
3. Caracterizar el patrón de expresión de los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M* durante el desarrollo del oído interno en la formación y la maduración del CVG.
4. Estudiar el proceso de proliferación celular con marcadores específicos (PCNA, PH3 e incorporación de BrdU) y el grado de maduración de los neuroblastos (neuroblastos tempranos: Islet 1/2, Tuj1, neuroblastos tardíos: G4, 3A10, TrkC) que van a formar parte del CVG.
5. Estudiar la implicación del IGF-I en las distintas fases de la neurogénesis del CVG (delaminación, proliferación, supervivencia y diferenciación) mediante la caracterización de la expresión de los marcadores mencionados.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Extracción de embriones.

Los huevos fecundados de gallina *White leghorn*, procedentes de la granja Santa Isabel (Córdoba), se incubaron a 38°C en atmósfera húmeda durante los tiempos adecuados para la obtención de embriones de distintos estadios de desarrollo, según la clasificación de Hamburger y Hamilton que se especifica en la tabla 2 (Hamburger y Hamilton, 1951). Se abrieron los huevos y con unas tijeras de disección se cortó la vascularización que rodea al embrión. Con unas pinzas de puntas finas se extrajo el embrión, se llevó hasta una placa con tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS) y se procedió a eliminar las membranas que protegían al embrión bajo un estereomicroscopio binocular Leica MZ8 (Figura 5).

Estadio HH	Tiempo de incubación	Estadio HH	Tiempo de incubación
11	40-45 h	18	65-69 h
12	45-49 h	19	68-72 h
13	48-52 h	20	70-72 h
14	50-53 h	21-22	3,5d
15	50-55 h	23-24	4d
16	51-56 h	25	4,5-5 d
17	52-64 h	26-27	5 d

Tabla 2. Tiempos de incubación de los huevos embrionados utilizados en este trabajo. Los tiempos se dan en horas (h) o en días (d) y se sigue la clasificación de Hamburger y Hamilton, 1951 (HH).

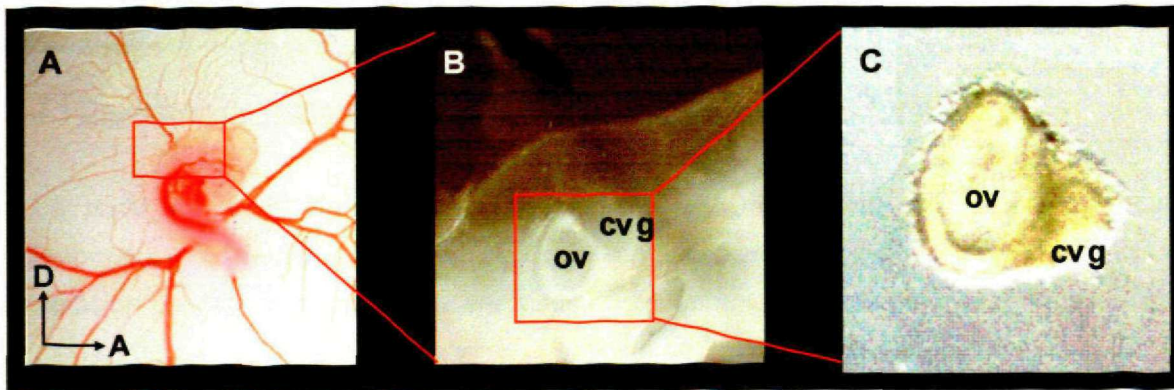


Figura 5. Extracción de embriones de pollo y disección de la vesícula ótica. Microfotografías que muestran el proceso de extracción de la OV a partir de un embrión HH19. Aspecto del embrión tal y como se ve al abrir una ventana en el huevo (A). Detalle del recuadro en rojo, una vez el embrión se ha extraído del huevo y se ha inmovilizado en una base de Sylgard (B). Detalle de la OV con su CVG asociado una vez se ha aislado del embrión (C). ov, vesícula ótica; cvg, ganglio cócleovestibular; A, anterior; D, dorsal.

2. Cultivos organotípicos de vesículas óticas.

Una vez retiradas las membranas que rodean al embrión se colocó en una placa con una base de Sylgard Brand 184 (Base y Curing Agent, Dow Corning, Wiesbaden, Alemania) y medio M199 con sales de Hanks y Hepes 20 mM (BioWhittaker, Maryland, EEUU) (Figura 5B). Se fijó a esta con unas agujas de entomología y con unas pinzas de disección finas se rasgó el ectodermo por debajo de la vesícula ótica, situada entre las dos primeras hendiduras branquiales. Esta fisura se prolongó perpendicularmente hacia la zona dorsal, rodeando a la vesícula ótica por detrás y por delante, abriendo así una ventana que la deja al descubierto. La vesícula se extrae separándola del mesénquima circundante y, si el experimento lo requiere, de su CVG asociado. Una vez extraídas las vesículas necesarias, según el experimento a realizar, se traspasan con una pipeta a una placa de cultivo de cuatro pocillos (NUNC, Roskilde, Dinamarca) (Figura 5C). Se incubaron a 37°C, 95% de humedad y con 5% de CO₂ (Leon y cols., 1995), en medio de cultivo M199 con sales de Earle y bicarbonato, suplementado con glutamina 2 mM (BioWhittaker) y antibióticos (penicilina 50 IU/ml y estreptomicina 50 µg/ml; Biochrom, Berlín, Alemania). Este medio es al que se le denomina medio definido y a las vesículas así tratadas se nombran como OS o control. El IGF-I utilizado es recombinante humano (National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA, EEUU) y se usa a 10 nM. El anti-IGF-I es un anticuerpo policlonal que se usa a una dilución 1/100 (National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA, EEUU); JB1 (20 µg/ml) es un péptido inhibidor del IGF-I, análogo al factor por lo que es capaz de unirse a su receptor de alta afinidad impidiendo así la unión al IGF-I (Immunological and Biochemical Test systems GMBH-IBT, Reutlingen, Alemania) (Pietrkowski y cols., 1992).

2.1 Detección de la incorporación de 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU).

La BrdU es un agente que se intercala en el ADN durante la proliferación y que posteriormente se puede detectar mediante un anticuerpo anti-BrdU. Para estudiar la proliferación celular se incubaron las vesículas óticas durante distintos tiempos y en los últimos 45 minutos del experimento se sometieron a un pulso de BrdU (Sigma, St Louis, Missouri, EEUU) (3,1 µg/µl). Tras el cual se lavaron con PBS. Se fijaron 2 horas en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y 0,3% de Triton (PBT). Se permeabilizaron en PBS con 1% de Triton durante 30 minutos y se lavaron 2 veces de la misma manera que anteriormente durante otros 30 minutos. Se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) y 5% de suero de cabra (NGS) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EEUU) en PBT. A continuación se incubaron con un

anticuerpo anti-BrdU monoclonal de ratón (Sigma) (Nakamura y cols., 1991), 1/1000 en solución de bloqueo a 4°C, durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron varios lavados de 15 minutos cada uno, con PBT y se incubaron los explantes durante 2 horas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa 488 diluido 1/400 en solución de bloqueo, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras esta incubación, se hicieron lavados en PBT y se montaron en portaobjetos excavados con Vectashield (Vector Laboratorios, Inc.). Se hicieron fotografías con un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Heilderberg, Alemania) y se procesaron con el software de Leica y con el Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc, EEUU).

2.2 Extracción de ARN y RetroTranscriptase Polimerase Chain Reaction.

A partir de las vesículas óticas de distintos estadios con su CVG asociado y se extrajo el ARN utilizando el kit *Absolutely ARN Microprep kit* (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU). El número de explantes utilizados depende del estadio: 16 VOs de estadio HH16, 10 VOs de estadio HH18, 7 VOs de estadio HH19, 4 VOs de estadio HH20 y 3 VOs de estadio HH21. Cada grupo de OV's se lisó en tampón de lisis y se purificó el ARN siguiendo las indicaciones del fabricante.

El ARN obtenido se retrotranscribió a ADNc (RT) utilizando el kit *SuperScript First Strand Synthesis System* (Invitrogen Ltd., Paisley, UK). La transformación se realizó mediante *Random Primers* siguiendo el protocolo que se adjunta. Brevemente, el ARN se incubó a 65°C durante 5 minutos para su desnaturalización, se añadió la enzima SuperScript II, que es una transcriptasa reversa que sintetiza el ADNc y se realizó el proceso de transformación a 42°C durante 50 minutos y a 70°C durante 15 minutos en el termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., BioRad, Hercules, CA, EEUU).

El ADNc se amplificó directamente por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con los *primers* indicados en la Tabla 3. Se preparó una mezcla de 5µl tampón 10x, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (AB Laboratorios, Warrington, UK), 1U de TaqGold Polimerasa (Roche Farma S.A., Mannheim, Alemania), los *primers* (Tabla 3) a 0,5 pmol/µl y 2µl de ADNc en un volumen final de 50µl. Se programó en el termociclador la temperatura de anillamiento de los *primers* que era en torno a los 57°C por lo que se utilizó el siguiente programa: paso 1, 10 minutos a 94°C; paso 2, 30 segundos a 94°C; paso 3, 30 segundos a 57°C; paso 4, 1 minuto a 72°C; paso 5, repetir el paso 2, 3 y 4, 29 veces y paso 6, 7 minutos a 72°C. Para los *primers* de p75 se varió el número de ciclos a 35. La expresión constitutiva de GAPDH se utilizó como control de carga. Una vez finalizada la PCR se preparó un gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 1% y se fotografió en una cámara Syngene (Cambridge, UK).

Tabla 3. *Primers* utilizados (F, forward 5'-3'; R, reverse 5'-3') (Yao y cols., 1994):

Gen	Primers	Tamaño
TrkA	F: GAGCAACTTCATCGAGAA R: GCTTCATGTACTCGAAGACC	370bp
TrkB	F: CAACTCCCAGGCTCCAGACA R: GATGCCAGTGACAATGCCCG	499bp
TrkC	F: GATTGTGGCCACCAACCA R: ACCCCAAATGTGTCCTCC	171bp
p75	F: ACGAGGTGATGGTGAAGGAG R: TACAGGCTCTCAGCGATGTC	727bp
NGF	F: GTGTGTGACAGTGTGAGCATG R: ATTTACAGGCTGAGGTAGGGG	377bp
BDNF	F: CGTGGGGAAGTGAAGCGTC R: TAAACCGCCAGCCAACTC	289bp
NT-3	F: CTAAGGCAGCAGAGACGC R: TTCCAGTGCTTGTGCGTCA	365bp
GAPDH	F: GGCTGCTAAGGCTGTGGGGA R: TATCAGCCTCTCCACCT	546bp

3. Inmunohistoquímica.

3.1 Inmunohistoquímica en secciones.

Los embriones de distintos estadios se obtuvieron como se detalla en el apartado 1. Tras limpiarlos de membranas, se fijaron toda la noche en paraformaldehído 4%, se lavaron en PBS y se crioprotegieron en sacarosa al 15% en PBS. Se embebieron en la mezcla de sacarosa 15% y gelatina 7,5% (Sigma) en PBS a 37°C. Con esta misma mezcla se hicieron moldes que se dejaron solidificar con los embriones orientados sagitalmente en el centro del molde. Una vez que los bloques se habían solidificado, se congelaron a -75°C en isopentano durante unos 30 segundos y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Se hicieron las secciones de 20 µm en el criostato Cryocut 1900 (Leitz, Jena, Alemania), se recogieron en portas electrostáticos Superfrost Plus Slides (Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, EEUU). En algunos casos las secciones están hechas a partir de vesículas óticas aisladas y no de embriones enteros, siguiendo la misma metodología.

Para la inmunohistoquímica las secciones se incubaron en PBS a 37°C durante 15 minutos. Los cortes se hidrataron mediante lavados de 5 minutos en PBS y PTW (PBS, 0,1% Tween-20). El bloqueo se realizó en cámara húmeda con 5% de suero de cabra en PTW durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las secciones con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en solución de bloqueo, en cámara húmeda y a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los especificados en la Tabla 4. Las secciones se lavaron tres veces en PTW, 15 minutos cada lavado y se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína diluido 1/400 en solución de bloqueo, en cámara húmeda y oscuridad, a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron, anti conejo o anti ratón unidos a Alexa Fluor 488 (fluoróforo verde) y a Alexa Fluor 594 (fluoróforo rojo) (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU). Las secciones fueron posteriormente montadas con medio de montaje VectaShield (Vector) y fotografiadas en el microscopio confocal (Leica). El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el programa Adobe Photoshop 7.0. Se analizaron al menos seis embriones o explantes por condición de al menos tres experimentos diferentes.

3.2 Inmunohistoquímica doble.

Se siguió el mismo protocolo que para las inmunohistiquímicas simples, explicado en el apartado 3.1, los anticuerpos primarios se diluyeron conjuntamente en la solución de bloqueo y fueron escogidos teniendo en cuenta que sus correspondientes secundarios pertenecieran a distintas especies y tuvieran distintos espectros de emisión. La incubación con los anticuerpos secundarios también se efectuó simultáneamente y se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia o en el confocal.

3.3 Inmunohistoquímica en explantes de vesículas óticas.

Se realizaron los cultivos organotípicos tal y como se han descrito en el apartado 2. Una vez se completaron los periodos de incubación, según el experimento a realizar, se fijaron los explantes en paraformaldehído al 4% durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron con PBT y se siguió el protocolo explicado en la parte final del apartado 2.1 para la detección de la incorporación de BrdU, se permeabilizaron en PBS con 1% de Triton durante 30 minutos y se lavaron 2 veces en PBT durante otros 30 minutos. Se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 2% de BSA y 5% de NGS en PBT antes de incubar con el anticuerpo adecuado siguiendo el protocolo que se explica en el apartado 3.1.

Tabla 4. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Tipo	Dilución	Reconoce	Procedencia	Bibliografía
BrdU	Monoclonal ratón	1/1000	BrdU intercalada en el ADN	Sigma ¹	Nakamura y cols., 1991
Islet1/2	Monoclonal ratón	1/200	Porción carboxiterminal de Islet	Hybridoma bank ²	Yamamoto y Henderson, 1999
PCNA	Monoclonal ratón	1/400	Antígeno nuclear de proliferación celular	Concepta ³	Waseem y Lane, 1990
PH3	Policlonal conejo	1/200	Histona 3 fosforilada en Ser10	Upstate Biotechnol ⁴	Ajiro y cols., 1996
3A10	Monoclonal ratón	1/500	Neurofilamento	Hybridoma bank ²	Phelps, 1999
G4	Policlonal conejo	1/1000	Glicoproteína neuronal	Dr Enrique de la Rosa ⁵	Hernandez- Sanchez y cols., 1995
TrkC	Policlonal conejo	1/200	Dominio extracelular trkC	Dra Frances Lefcort ⁶	Lefcort y cols., 1996; Cochran y cols., 1999
Receptor de IGF-I	Policlonal conejo	1/200	N-terminal del precursor humano IGF-IR	Sta Cruz ⁷	Li y cols., 1993
Tuj1	Policlonal ratón	1/200	Tubulina III	Hybridoma Bank ²	Lee y cols., 1990

¹ Sigma, St Louis, Missouri, EEUU.² Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, EEUU.³ Concepta, Barcelona, España.⁴ Upstate Biotechnology, Upstate Group Inc., Waltham, MA, EEUU.⁵ Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España.⁶ WWAMI Medical Education Program, Montana State University, Montana, EEUU.⁷ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU.

4. Hibridación *in situ*.

4.1 Hibridación *in situ* en embriones enteros.

La hibridación *in situ* en los embriones enteros se realizó según se describe en (Henrique y cols., 1995), usando sondas de ARN marcadas con digoxigenina. Todas las sondas utilizadas son de pollo: Neuro D, Neuro M (Laufer y cols., 1997) (cedidas por Dr. Domingos Henrique, Universidad de Lisboa) y TrkC (cedida por el Dr. Alfredo Rodríguez Tebar del Instituto Cajal, CSIC, Madrid). La ribosonda antisentido Neuro D se obtuvo por transcripción con la polimerasa de T3 (Promega, Southampton, UK) a partir del plásmido pKS-NeuroD, tras linearizar con EcoRI

(Invitrogen, Paisley, UK). La sonda antisentido de Neuro M se transcribió a partir del plásmido pBSK-Neuro M tras linealizarlo con HindIII (Invitrogen) y utilizar la polimerasa T3. La sonda antisentido para TrkC se obtuvo a partir del plásmido pCRII-trkC linearizado con BamHI (Fermentas, Burlington, Canada) y transcribiendo con la polimerasa T7 (Promega). Como control se usaron las sondas sentido. Para obtener la sonda sentido de Neuro D se linearizó con XhoI (Gibco) y se transcribió con T7 (Promega). Para la de Neuro M se linearizó con XbaI (Invitrogen) y se transcribió con la polimerasa T7 y para la de TrkC se linearizó con NotI (Invitrogen) y se transcribió con SP6 (Promega).

El tampón de hibridación contenía 50% de formamida desionizada pura 45g/mol, 5X de tampón citrato sódico salino SSC (75mM NaCl y 75mM citrato sódico) pH 4,5, 1% de SDS, 50 µg/ml de ARNt de levadura, 0,2% Tween-20 y 100 µg/ml de heparina. Los embriones se hibridaron con las ribosondas marcadas con digoxigenina, 2 µg/ml, y disueltas en el tampón de hibridación durante toda la noche a 70°C. Posteriormente, los embriones se lavaron secuencialmente con las siguientes soluciones según se indican a continuación: solución I (50% de formamida, 1% de SDS, 5x de SSC pH 4,5), solución II (50% de formamida, 2x de SSC), TBST (150 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM Tris pH 7,5, 0,1% Tween-20). Se bloquearon en 10% de suero de cabra disuelto en TBST y se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (DIG-AP) a una dilución 1/2000 y se revelaron con 0,26 mg/ml NBT (Roche) y 0,175 mg/ml BCIP (Roche), disueltos ambos, en NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl₂ y 0,1% Tween-20). Tras desarrollarse el color, los embriones se postfijaron en paraformaldehído al 4% (Merck, Darmstadt, Alemania). Se analizaron al menos 5 embriones por condición en tres experimentos diferentes.

4.2 Hibridación *in situ* en secciones.

Se utilizaron las mismas sondas que se han descrito en el apartado anterior. Las secciones se realizaron como se ha descrito en el apartado 3.1 y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se sacaron los portas durante media hora a temperatura ambiente. Se distribuyen en cada porta 75 µl de sonda diluida en tampón de hibridación, 2 µg/ml, como se ha descrito en el apartado 4.1, se cubre con un cubreobjetos. Se incubaron toda la noche en cámara húmeda a 65°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces a 65°C con una solución que llevaba 50% de formamida y 1x SSC. Después se lavaron con TBST, se bloquearon con TBST, 2% de blocking reagent (Roche) y 10% de suero de cabra durante 1 hora y se revelaron con NBT/BCIP tal y como se describe en el apartado anterior.

4.3 Hibridación *in situ* en explantes de vesículas óticas.

Los explantes se obtuvieron siguiendo las indicaciones anotadas en el apartado 2. En cuanto a la hibridación *in situ* se realizó tal y como se describe en el apartado 4.1. Las únicas variaciones que se realizaron fueron referentes a la preparación del tejido. Los explantes una vez se fijaron y lavaron se trataron con Proteinasa K (Sigma) 10 µg/ml en PBS durante 1 minuto. Se postfijaron en 4% de paraformaldehído y 0,2% de glutaraldehído en PTW. Se lavaron con PTW y se procedió a la hibridación con la sonda correspondiente a 70°C durante toda la noche siguiendo los pasos fueron descritos en el apartado 4.1.

4.4 Hibridación *in situ* doble en secciones.

Las secciones se obtuvieron tal y como se describe en el apartado 2. Las dos sondas que se utilizaron se marcaron con digoxigenina y fluoresceína respectivamente. Se sacaron los cortes almacenados a -20°C media hora antes de comenzar el proceso y se sumergieron en solución de hibridación (50% formamida desionizada, 1,3x SSC pH 4,5, 5 mM EDTA, 0,05 mg/ml tARN, 0,1% Tween-20, 0,5% CHAPS (Sigma), 0,1 mg/ml heparina). Tras 1 hora a 65 °C se añadieron las dos sondas disueltas en la solución de hibridación y se incubaron toda la noche en cámara húmeda, a 65°C y con cubreobjetos. Al día siguiente, se lavaron con solución de hibridación y con MABT (0,4 M ácido málico, 0,75 M NaCl, 0,1% Tween). Se bloquearon en 10% de suero de cabra, 2% de blocking reagent disuelto en MABT durante 2 horas y se incubaron con el anticuerpo anti-DIG-AP 1/3500 durante toda la noche a 4°C. Se lavaron las secciones con MABT y se revelaron con NBT/BCIP tal y como se ha descrito en el apartado 4.1. Una vez se reveló la primera sonda se procedió a quitar el anticuerpo. Se trataron las secciones con 0,1 M glicina pH 2,2 durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PTW. Tras este tratamiento las secciones se volvieron a bloquear como se había hecho anteriormente y se pusieron a incubar esta vez con el anticuerpo anti-fluoresceína-fosfatasa alcalina (FLUO-AP) 1/2000. Posteriormente se lavaron las secciones con MABT y se preparó una solución de 0,4 M NaCl, Tris 0,1 M pH 8,2 en la que se disolvió una pastilla de FastRed (Roche). La mezcla se filtró con un filtro de 0,45 µm antes de usarla para el segundo revelado. Este segundo revelado se realizó a 4°C durante 12 horas hasta que se evidenció el marcaje rojo a simple vista. Se montaron las secciones con glicerol puro y se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia Nikon y en el mismo microscopio en campo claro.

4.5 Hibridación *in situ* seguida de inmunohistoquímica en secciones.

Cuando se quisieron combinar hibridación *in situ* e inmunohistoquímica se siguió el protocolo de hibridación que se describe en el apartado 4.2, en el que se explica un revelado con NBT/BCIP que da un precipitado azul visible. Como alternativa se utilizó este mismo protocolo hasta el paso del revelado que se realizó con un compuesto fluorescente, Fast Red (Roche), que tiene un espectro de emisión de 540 nm-590 nm siendo su máximo a 562 nm. Para preparar este revelado se preparó una solución de 0,4 M NaCl, Tris 0,1 M pH 8,2 para disolver una pastilla de FastRed que se filtró con un filtro de 0,45 µm. Una vez se reveló la hibridación *in situ* de cualquiera de las dos maneras propuestas se lavaron las secciones con PBS y se continuó con el protocolo explicado para la inmunohistoquímica en el apartado 3.1.

5. Detección de la muerte celular por *Terminal Transferase mediated dUTP biotin Nick End Labelling* (TUNEL).

La distribución de las células apoptóticas en explantes de vesículas óticas se determinó mediante la técnica de TUNEL que detecta la fragmentación del ADN característica de la muerte celular. Se realizó según las instrucciones del fabricante adaptadas a tejidos (Frago y cols., 1998 y 2003). Las vesículas óticas se fijaron en 4% paraformaldehído toda la noche a 4°C. Se permeabilizaron con 1% Triton X-100 durante 30 minutos a 37°C, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 20 µg/ml Proteinasa K (Sigma) durante 10 minutos a 37°C. Se postfijaron con 4% de paraformaldehído y 0,2% de glutaraldehído en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron cuatro veces con BGT (0,25% Triton X-100, 100 mM Glicina, 30 mg/ml BSA en PBS) durante 15 minutos. Se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL 1:10 (Roche) durante 90 minutos a 37°C. Se lavaron con 0,25% Triton X-100 en PBS dos veces durante 15 minutos y posteriormente con PBS tres veces durante 15 minutos. Se montaron en portas excavados con medio de montaje VectaShield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Las fotografías se obtuvieron en el microscopio confocal (Leica). Se analizaron al menos 5 vesículas por condición de cuatro experimentos distintos.

6. Trazadores celulares: Dil y DiO.

Para estudiar el destino celular de los neuroblastos que delaminan desde la zona neurogénica se utilizaron dos trazadores lipofílicos fluorescentes de larga cadena de carbocianinas, Dil (espectro de emisión máximo 594 nm) y DiO (espectro de emisión máximo 488 nm) (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, EEUU). Se abrieron pequeñas ventanas en la

parte de la cáscara del huevo que cubre la cámara de aire, previa eliminación de unos 2 ml de clara con una jeringa de 5 ml, se retiró la membrana vitelina de manera que se dejó expuesta la parte ótica donde se depositaron los trazadores. Se disolvieron en dimetilformamida a una concentración final 0,5% calentándose a 40°C y se centrifugaron 1 minuto antes de usarlos. Utilizando un capilar estirado se depositaron dos gotas del trazador Dil en la zona de interés, con ayuda de un micromanipulador, y se volvió a cerrar la ventana que se había abierto. Los huevos así inyectados se dejaron incubando 24 horas al cabo de las cuales algunos de ellos se sacaron y se fotografiaron y con otros se volvió a realizar la misma operación con el otro trazador prolongando la incubación otras 24 horas. Tras este periodo se sacaron los embriones y se hicieron varias escisiones hasta que la parte ótica quedó aislada y se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia.

7. Análisis estadístico y morfométrico de los resultados obtenidos en explantes de las vesículas óticas.

El área del ganglio generado en los cultivos organotípicos de vesículas óticas fue estimada siguiendo métodos estereológicos (Camarero y cols., 2001). Se proyectó una retícula en un microscopio Nikon TMS equipado con un objetivo 10x, acoplado a una cámara Nikon HFX-D. Se estimaron las áreas siguiendo la fórmula $\Sigma Pi a(p)$, donde $a(p)$ es el área asociada a cada punto de la retícula $a(p)=0,0027 \text{ mm}^2$ y donde Pi es el número de puntos que se cuentan. El área de referencia fue la estimada para 34 CVG en condiciones OS; $134 + 3,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$. Se analizaron 34 explantes por condición experimental. La significancia estadística se analiza por el test estadístico ANOVA.

El área de las vesículas óticas y los CVGs en los experimentos de incorporación de BrdU se midió utilizando el programa ImageJ y con el programa *analySIS* (Soft Imaging System, Olympus Gmh. Hamburgo, Alemania cedido por el servicio de imagen del Instituto de Investigaciones Biomédicas). Los datos se procesaron con el programa Excel obteniendo la media y la desviación estándar. Se analizaron 3 experimentos independientes en los cuales había al menos 3 explantes por condición experimental.

La densidad de las células que expresan BrdU se contó con el programa ImageJ. Se trataron previamente en el Adobe Photoshop pasando las microfotografías a escala de grises e invirtiéndolas. Posteriormente se contaron refiriéndolas a unidades arbitrarias de superficie utilizando cuadros de 100 x 100 píxeles. Los datos obtenidos se procesaron con el programa Excel obteniendo la media y la desviación estándar. Se analizaron 3 experimentos independientes en los cuales había al menos 3 explantes por condición experimental.

Los soportes fotográficos utilizados a lo largo de este trabajo fueron los siguientes: las microfotografías de los experimentos realizados en embriones enteros o en explantes de OV's sin cortar en el criostato fueron realizadas en una cámara Leica DFC320 asociada a un estereomicroscopio Leica MZ8.

Las microfotografías realizadas a secciones en el criostato se realizaron bien en la cámara Olympus DP70 asociada al microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot o bien en el microscopio confocal Leica TCS SP2 con software Leica asociado.

Las imágenes adquiridas y los dibujos fueron procesados con el programa Adobe Photoshop 7.0.

Resultados

RESULTADOS

1. Función del IGF-I endógeno en la formación del CVG.

El CVG se forma por la delaminación de los neuroblastos desde el epitelio ótico de la vesícula ótica. Se ha descrito que los explantes de OV de estadio HH18 cultivados en un medio definido en ausencia de suero generan CVG, poniéndose así de manifiesto la autonomía de este proceso tanto en aves (Leon y cols., 1999) como en mamíferos (Miura y cols., 2004). Con el fin de explorar el papel que desempeña el IGF-I en la formación del CVG se realizaron dos aproximaciones experimentales en las que se bloqueó la acción del IGF-I endógeno. Por una parte, se añadió al medio de cultivo el anticuerpo bloqueante anti-IGF-I que se une al factor IGF-I impidiendo así la unión a su receptor y, por otra parte, se incubaron las vesículas óticas en presencia de un péptido análogo estructural del IGF-I, JB1, que compite por su receptor de alta afinidad anulando su acción (Pietrzkowski y cols., 1992). Como se muestra en la Figura 6, el bloqueo de la acción del IGF-I endógeno por cualquiera de los dos procedimientos alteró la formación del CVG generándose al cabo de 24 horas un CVG de tamaño reducido (Figura 6, I, paneles E y H) o inexistente (Figura 6, I, F e I). También se observó una alteración en la morfología de las vesículas óticas. Aquellas en las que la acción endógena del factor se había inhibido (Figura 6, anti-IGF-I y JB1) eran más pequeñas, redondeadas y con un grosor de epitelio más homogéneo que las vesículas óticas control, OS, a las que se les había suprimido el suero pero no se les había añadido ningún agente inhibidor (Figura 6, A-C).

Se hizo una estimación cuantitativa del tamaño de los CVGs de 34 explantes medidos mediante técnicas estereológicas (Figura 6, II). Se calculó en la condición OS, el valor que más veces se repite (moda), se vio que era $160 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$ y se consideró a este valor el tamaño normal del CVG, por encima del cual los explantes se consideraron grandes, y por debajo del cual se consideraron pequeños. Así se comprobó que en presencia del anticuerpo anti-IGF-I se generó un ganglio normal en el 23% de los explantes cultivados y medidos, mientras que en un 56% se desarrollaron CVGs más pequeños y en un 21% no se desarrolló ganglio. El tratamiento con JB1 produjo efectos similares, observándose que en un 21% no se produjo ganglio, en un 59% estos fueron más pequeños y en un 21% fueron normales. Estos datos indican que el IGF-I endógeno es necesario para la génesis del CVG de tamaño normal en cultivos de explantes de vesículas óticas.

2. Descripción de la neurogénesis del CVG.

La neurogénesis es el proceso por el cual las células nerviosas se generan y se organizan para formar el sistema nervioso de los animales. La generación de las neuronas óticas funcionales es un proceso secuencial que comienza cuando los precursores neurales epiteliales adquieren competencia neural, continúa con la migración de los neuroblastos epiteliales para formar el CVG, con la proliferación y la supervivencia celular de los neuroblastos ganglionares, y concluye con su diferenciación hacia neuronas funcionales que conectan con el sistema nervioso central.

2.1 Estudio de la delaminación de los neuroblastos que van a formar el CVG.

Mediante trazadores celulares se realizó un seguimiento de los neuroblastos que abandonan el epitelio ótico para formar el CVG, con la intención de comprender mejor este proceso. En la Figura 7 se muestra el marcaje con dos trazadores celulares vitales, Dil y DiO. En la parte I de la figura se muestra un embrión de pollo en estadio HH11, que fue el estadio en el que se microinyectó el primer trazador, Dil, que marca en rojo a las células que lo internalizan. La administración tuvo lugar en la zona neurogénica placodial. Tras un intervalo de tiempo de 24 horas se muestra una imagen del mismo embrión en un estadio más avanzado, HH14, al que se inyectó, en la misma zona, el segundo trazador, DiO, que se observa en verde las células. 24 horas más tarde se observó que en la región neurogénica no había una mezcla de ambos colorantes situándose las células marcadas en rojo más distales respecto a las marcadas en verde. Esto indica que los neuroblastos que delaminan para formar el CVG lo hacen de manera secuencial, situándose en la zona proximal al epitelio neurogénico los últimos que delaminan. La administración de uno sólo de los trazadores en diferentes estadios HH11, HH14-15, HH16, HH17 y HH18, indicó que tras 24 horas de incubación aparecen siempre neuroblastos coloreados en una zona cercana a la zona de administración del trazador. Estos resultados indican que la delaminación es constante y secuencial en los estadios estudiados. En los paneles de la parte II de la Figura 7 se muestra el esquema del procedimiento experimental seguido.

2.2 Estudio del patrón de expresión de los genes proneurales durante el desarrollo del oído interno.

Neuro D y *Neuro M* son dos genes proneurales miembros de una familia de genes implicados en la regulación del desarrollo neural de los estadios tempranos del desarrollo neural en diferentes especies tanto de invertebrados como de vertebrados, incluyendo el pollo. Actúan

en la especificación y la diferenciación neuronal de distintas partes del sistema nervioso (Bertrand y cols., 2002). Los ratones deficientes en estos dos genes sufren alteraciones en el CVG debidas una delaminación aberrante de los neuroblastos desde el epitelio neurogénico que causa pérdida de neuronas por apoptosis (Liu y cols., 2000; Kim y cols., 2001) (Tabla 1).

2.2.1 La función de *Neuro D* y *Neuro M* en la especificación de la competencia neuronal del CVG.

Para abordar el estudio de la función de los genes proneurales en la neurogénesis del CVG, lo primero que se hizo fue analizar la expresión de los genes, *Neuro D* y *Neuro M*. Se analizó su expresión desde los estadios HH11-12 hasta HH26-27. Estos estadios abarcan el periodo de formación del CVG y de su segregación en los ganglios coclear y vestibular, antes de que las fibras que nacen de cada uno de los ganglios lleguen a establecer las conexiones con sus destinos finales (Rubel y Fritsch, 2002). En estadios anteriores (HH11-13) no se ha visto marcaje ni para *Neuro D* ni para *Neuro M*. En la Figura 8, A y F, se muestran imágenes de embriones de pollo enteros de estadio HH14 donde se puede observar algún neuroblasto expresando *Neuro D* y *Neuro M*, no sólo en la zona neurogénica (ZN) desde donde delaminarán los neuroblastos que van a formar el CVG, sino también en otros ganglios craneales como el ganglio geniculado y el ganglio trigémino. En los paneles de la derecha (B-J) lo que se muestra es un detalle de cortes sagitales de 20 µm de grosor de estos mismos embriones, desde la zona medial del embrión hasta una zona más lateral. Se puede resaltar que ya en el estadio HH14 existe una expresión de ambos genes en los neuroblastos que están surgiendo, determinando así la zona neurogénica. En este estadio la expresión de *Neuro M* es más extensa que la de *Neuro D*, sobre todo en la parte medial como se representa en los esquemas dibujados en la Figura 8. La expresión de *Neuro D* se reduce exclusivamente a los neuroblastos epiteliales, lo que sugeriría que la expresión de *Neuro M* en los neuroblastos epiteliales comienza antes que la de *Neuro D* (Figura 8). Una vez estudiado el comienzo de la expresión de estos dos genes proneurales en la OV y su CVG asociado, se continuó con el estudio de la expresión en estadios más avanzados del desarrollo (Figura 9). Se puede observar que la expresión de *Neuro D* y de *Neuro M* comienza en la parte proximal al epitelio ótico cercana a la zona neurogénica y según se avanza en el desarrollo esta expresión se extiende hacia áreas más distales (A-E y F-J respectivamente). En el estadio HH16, cuando aún no se ha cerrado la copa ótica, ambos genes se expresan tanto en los neuroblastos epiteliales como en los ganglionares que ya han delaminado. La expresión continúa en el estadio HH18, apreciándose un aumento en los niveles de la expresión de *Neuro M*, con un mayor número de células positivas distales a la zona neurogénica en comparación con *Neuro D* (G y B). Esta tendencia se mantiene en los estadios

HH20 (C,H), HH21 (D,I) y HH23 (E,J). A partir del estadio HH23 el CVG se dispone en una posición más medial y se pierde la visión del ganglio en este tipo de microfotografías del embrión *in toto*, por lo que el estudio de la expresión en estadios más avanzados se realizó en cortes de criostato.

En la Figura 10 se muestran cortes sagitales consecutivos de la parte medial de la vesícula ótica de embriones de estadio HH23 mostrando las áreas de expresión de *Neuro D* (B-D), y de *Neuro M* (F-H). Se realizaron dibujos esquemáticos representando la expresión de cada marcador, que se corresponde a lo observado en las secciones (A, E). La comparación de las zonas de expresión de *Neuro D* y *Neuro M* evidencia un patrón de expresión similar. Los neuroblastos ganglionares expresan mayoritariamente ambos genes proneurales aunque hay algunos neuroblastos epiteliales positivos para ambos. Se observa que hay una zona en el CVG en la que no aparece expresión de ninguno de los dos genes proneurales, zona que podría corresponder a precursores neuronales ya diferenciados ya que se marca con TrkC (Figura 15, H y J). Sin embargo es visiblemente distinguible que la expresión de *Neuro D* (B-D) es más intensa y se concentra en la parte proximal al epitelio neurogénico mientras que *Neuro M* se expresa preferiblemente en las zonas más distales (F-H).

2.2.2 La función de NeuroD y NeuroM en la adquisición de la identidad coclear y vestibular.

A partir del estadio HH25 el CVG generará dos ganglios diferenciados, el coclear y el vestibular, que inervarán las zonas homónimas del oído interno adulto. Una de las preguntas a realizar era cuándo se adquiere la identidad coclear frente a la vestibular. Varios grupos han estudiado esta cuestión sin obtener datos concluyentes (Fekete y Wu, 2002; Satoh y Fekete, 2005). Del análisis de la expresión de los patrones de *Neuro D* y *Neuro M* se podía concluir que son similares pero no idénticos y en vista de que se había propuesto que en mamíferos NeuroD puede ser candidato para conferir una identidad vestibular en el CVG (Tabla 1) (Lawoko-Kerali y cols., 2004), se estudió si estos mismos genes proneurales en el pollo estaban participando en el establecimiento de la identidad coclear frente a la vestibular.

Los estudios clásicos sobre la formación del CVG apuntan a que la zona distal de expresión positiva para *Neuro M* es la correspondiente al futuro ganglio vestibular (D'Amico-Martel, 1982; Torres y Giraldez, 1998). La zona más proximal, donde hay más neuroblastos expresando *Neuro D*, sería la correspondiente al ganglio coclear. No se conocen marcadores claramente vestibulares o cocleares en estos momentos del desarrollo embrionario en pollo. Se analizaron factores de transcripción descritos en ratón, como el marcador coclear GATA-3 (Lawoko-Kerali y cols., 2004), pero en pollo se expresa en el mesénquima que rodea a la vesícula ótica y su CVG,

razón por la cual se descartó como marcador de la región ótica (Alsina, B. comunicación personal).

Se optó por estudiar la expresión de los genes proneurales en estadios más avanzados (HH25) en los que morfológicamente ya se puede distinguir la parte coclear del oído de la parte vestibular (Figura 10, I-P). El análisis de la expresión de Neuro D y Neuro M en estos embriones muestra que se produce expresión tanto en el área coclear como en el área vestibular. Los patrones de expresión de NeuroD y de NeuroM en estos estadios son por tanto semejantes. A la vista de estos datos no parece que estos genes actúen como marcadores de identidades neuronales diferentes.

Posteriormente se realizaron hibridaciones *in situ* dobles para resolver la duda de si existen en el epitelio zonas diferenciadas de expresión de ambos genes. Se pudo apreciar, una vez más, que la expresión de Neuro M (rojo) es más distal a la zona neurogénica que la expresión de NeuroD (azul) (Figura 10, Q y R). Sin embargo, no se pudieron apreciar dominios de expresión diferentes ni en el epitelio ótico ni en la zona neurogénica ya que en estas zonas las expresiones de ambos marcadores se solapan.

2.3 Estudio de la proliferación y la supervivencia celular.

Con el fin de comprender mejor la naturaleza de los neuroblastos se estudiaron los patrones de proliferación y supervivencia de los neuroblastos.

Se estudió en la Figura 11 la incorporación de BrdU (verde) como marcador de proliferación celular, y en estos mismos explantes la expresión de G4 (rojo) como marcador del comienzo de la arborización de las neuronas y de la extensión de neuritas (Hernandez-Sanchez y cols., 1995). En la Figura 11 se muestra el aspecto de las vesículas óticas cultivadas durante los tiempos indicados en la parte superior, en ausencia (A-D) o en presencia de IGF-I (E-H). Las vesículas óticas tras 8 horas de cultivo proliferan y comienzan a generar su CVG (B y F). Algunos de los neuroblastos ganglionares que se han generado ya comienzan a expresar G4 (B). A partir de las 20 horas de incubación la expresión del marcador de neuroblastos ganglionares, G4, es igual en los controles que en los tratados con IGF-I, de manera que el retraso en la generación del CVG que inicialmente se observaba en los explantes tratados con IGF-I no se observa en tiempos más largos de cultivo de 20 y 28 horas. La proliferación se mantiene hasta las 28 horas. Al comparar los explantes cultivados en ausencia de suero, OS, con los incubados con el IGF-I, se observa un aumento en el nivel de proliferación de estos últimos. A las 28 horas se puede observar también un aumento en la tasa de proliferación en la zona a partir de la cual se forma el conducto endolinfático y en el epitelio neurogénico (H, flechas). En la parte II de la Figura 11 se muestra un histograma con los datos obtenidos tras medir las áreas de las vesículas óticas y su CVG

asociado en cada uno de los tiempos y condiciones, así como, un gráfico en el que se representan la media de las células que incorporan BrdU y que por tanto están proliferando.

Para completar el análisis de la proliferación se estudiaron los patrones de expresión de otro marcador de proliferación celular, PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), en cortes de criostato de embriones de pollo (Figura 13). Se observó que en estadio HH18 la proliferación se concentra en los neuroblastos ganglionares que están en la parte próximo-ventral del epitelio ótico.

Tras observar que el IGF-I promueve la proliferación celular se estudió si esta capacidad está relacionada con la característica del IGF-I de mantener la supervivencia celular. Para ello se bloqueó la actividad del IGF-I endógeno con el péptido análogo JB1 y se analizó el efecto de la muerte celular programada mediante la técnica de TUNEL. La Figura 12 muestra los explantes de las vesículas óticas incubados en ausencia de suero que presentaban un nivel basal de células apoptóticas tras 48 horas de incubación (Figura 12, A). El cultivo de estos explantes en presencia de IGF-I promovió una disminución del número de células muriendo por apoptosis (Figura 12, B). Para averiguar el efecto del bloqueo del IGF-I en los niveles de apoptosis se incubaron los explantes durante 24 horas con el péptido bloqueante JB1 seguidas de otras 24 horas en medio definido y se observó un aumento en el número de células apoptóticas (C,D). Por el contrario, los explantes que tras ser bloqueados con JB1 durante 24 horas, se trataron otras 24 horas con IGF-I exógeno (E,F) presentaron un número reducido de células marcadas, algo menor al de la situación control, OS aunque mayor que aquellos explantes cultivados 48 horas con IGF-I. Con estas observaciones se comprobó que la supervivencia de las células del CVG depende de la expresión y actividad del IGF-I endógeno.

2.4 Estudio de la diferenciación de los neuroblastos inmaduros hacia neuronas funcionales.

La diferenciación temprana se evaluó analizando la presencia de un factor de transcripción de la familia de genes con homeodominio LIM relacionado con la neurogénesis, Islet 1/2 (Li y cols., 2004), y una β -tubulina III, Tuj1, mientras que en estadios más avanzados de diferenciación se estudió una fasciculina que es una proteína asociada a la arborización y proyección neurítica, G4 (Hernandez-Sanchez y cols., 1995) y la proteína de un neurofilamento, 3A10 (Sanchez-Calderon y cols., 2004). Se realizó un estudio de los patrones de expresión de estos marcadores en secciones de criostato obtenidos de embriones de pollo de diferentes estadios de desarrollo. La Figura 13, muestra el patrón espacio-temporal de la expresión de estas proteínas en el CVG. En el estadio HH18, la proliferación, medida por los niveles de PCNA, se concentró en la parte del CVG situada en la zona proximal a la vesícula ótica y en el epitelio

neurogénico (A). La expresión de Islet1/2 se localizó en la región antero-ventral del epitelio ótico solapando con la expresión de PCNA (B). Además, se pudo comprobar que las células positivas para Islet1/2 lo fueron también para el receptor de alta afinidad de IGF-I lo que indica que constituyen posibles dianas para el IGF-I (C, Islet1/2: rojo, IGFIR: verde).

En estadios más avanzados del desarrollo, HH21, se observó cómo los neuroblastos ganglionares eran positivos para Islet1/2, concentrándose en la zona más distal de la vesícula ótica convirtiéndose en precursores neuronales inmaduros que expresan antígenos neuronales postmitóticos como G4 (D, Islet1/2: rojo, G4: verde). La expresión de otros marcadores como Tuj1 y 3A10 es similar a la expresión de Islet1/2 y G4 respectivamente (E y F).

La secuencia temporal de diferenciación neuronal sería por tanto, la expresión de Islet1/2 y Tuj1, se produce en los neuroblastos ganglionares que acaban de delaminar de la zona neurogénica y cuando estos neuroblastos se convierten en precursores neuronales expresan G4 y 3A10 (Ver Figura 3).

La expresión de las neurotrofinas y de sus receptores estaba descrita a partir del día embrionario 6 (HH28) de incubación en el que su papel fundamental es el establecimiento de las conexiones neuronales y el desarrollo correcto de la parte coclear del oído interno de aves (Pirvola y cols., 1997). El receptor de neurotrofinas TrkC se escogió como marcador de diferenciación neuronal. Se había descrito que los ratones deficientes en este gen tenían problemas severos en el oído interno y que junto a TrkB constituía uno de los primeros receptores que se expresan en la zona ótica. Se analizó el patrón de expresión del receptor TrkC en embriones enteros desde HH14 hasta HH20 (Figura 14). La expresión de dicho receptor comienza en el estadio HH14, que corresponde al estadio de copa ótica. Esta observación sorprende por el hecho de que no se encuentra documentada en esta región la expresión de NT3, la neurotrofina que activa este receptor, hasta el día 6 embrionario (Pirvola y cols., 1997) y sin embargo se ha detectado mediante RT-PCR (Figura 14, II). La expresión a nivel de ARNm se mantiene a lo largo de todo el periodo estudiado (HH14-HH20). Al principio, la expresión se reduce a un pequeño grupo de células fuera ya del epitelio ótico, en la zona neurogénica (A, B y C). Según se analizaron embriones de estadios mayores la expresión en el CVG es más distal a la zona neurogénica (D, E y F). En los últimos estadios analizados (HH19-20) se pudo ver que la expresión era más distal aún a la zona neurogénica y más extensa respecto a los estadios anteriores. Correspondiendo con zonas pobladas por neuronas maduras que comienzan a establecer conexiones con el epitelio sensorial (G, H).

Respecto a la expresión de los demás receptores y de sus correspondientes neurotrofinas se analizaron sus niveles de ARNm mediante RT-PCR de las vesículas óticas y sus CVGs asociados. Se detecta dicha expresión desde el estadio HH16 hasta el estadio HH21 aunque con distintos niveles (Figura 14, II). Se muestra también la cuantificación de las PCRs de p75, TrkA y

TrkB y se aprecia una tendencia a que la expresión de estos receptores aumente según avanza el desarrollo embrionario.

Una vez caracterizadas las expresiones de los marcadores de proliferación y diferenciación de los neuroblastos y visto que tenían patrones definidos, se estudia su expresión junto con la de los patrones de los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M* con el fin de establecer un patrón secuencial y temporal. El análisis de las expresiones conjuntas de estos marcadores sugiere que los genes proneurales constituyen un paso previo a la expresión de los marcadores de diferenciación que hasta ahora habían sido utilizados para la descripción de la neurogénesis del CVG. Así, la Figura 15 muestra la colocalización de *Neuro D* y *Neuro M* con los marcadores de proliferación PH3, diferenciación temprana Tuj1 en cortes horizontales de embriones de estadio HH25 (A-F) y con el marcador de diferenciación TrkC en cortes sagitales de estadio HH21 (G-J). La proliferación de los neuroblastos, marcada con PH3, se observa que se está produciendo tanto en las zonas con expresión de *Neuro D* como en las que expresan *Neuro M* (B y E). Al analizar la expresión del marcador de diferenciación temprana, Tuj1, se aprecia que colocaliza de manera parcial con la expresión de *Neuro D* y de *Neuro M* que se concentra en los neuroblastos ganglionares que acaban de delaminar y que todavía no han empezado a expresar Tuj1. También se observan neuroblastos ganglionares que se localizan en un área más distal a la zona neurogénica, que presentan expresión de Tuj1, y sin embargo todavía no están expresando ni *Neuro D* ni *Neuro M* (C y F). Si se observa la colocalización en el CVG de los genes proneurales con el marcador de diferenciación TrkC en las microfotografías de cortes sagitales (G y H), se observa que en el límite donde acaba la expresión de *Neuro D* o *Neuro M* y empieza la de TrkC existe una pequeña área de colocalización de ambas expresiones pero en el resto del CVG se pueden distinguir claramente dos áreas. Una de las áreas corresponde a la de expresión de los genes proneurales, este área esta compuesta por neuroblastos que acaban de delaminar para formar el CVG y están comenzando la diferenciación. La otra área es aquella en la que sólo se expresa el marcador TrkC que corresponde a precursores neuronales que son ya postmitóticos y están prácticamente diferenciados, además la expresión de TrkC coincide con aquellas zonas sin expresión de *Neuro D* ni *Neuro M* observados en el CVG en la descripción de los patrones de expresión de estos genes (Figura 10, A-H).

3. ¿Qué partes del proceso de la neurogénesis del ganglio cócleo-vestibular están moduladas por el IGF-I?

Como previamente se había demostrado el IGF-I es un factor de crecimiento capaz de mantener la generación de los neuroblastos ganglionares en ausencia de las señales que rodean al área de la vesícula ótica. Por otra parte, se había descrito que tanto la vesícula ótica como el

CVG del embrión de pollo expresan IGF-I endógeno y su receptor (Figura 2) y este mismo factor es capaz de inducir proliferación y supervivencia en explantes de OV y en el CVG (Leon y cols., 1995; Camarero y cols., 2003). A continuación se profundiza en el papel del IGF-I en las distintas etapas de la neurogénesis del CVG y se analiza la participación del IGF-I en las mismas.

3.1 Implicación del IGF-I en la especificación de la competencia neuronal y la delaminación de los neuroblastos inmaduros.

El primer paso fue estudiar si el IGF-I era necesario para la especificación del destino celular y la delaminación de los neuroblastos o si su implicación en este proceso era posterior a estos estadios tempranos de adquisición del destino celular y de la migración. Para ello se utilizaron los genes proneurales *NeuroD* y *NeuroM* como marcadores de los neuroblastos epiteliales que van a delaminar. La Figura 16 muestra como ambos genes se expresan en la zona neurogénica y en los neuroblastos ganglionares de todas las vesículas en las cuales se ha generado CVG, independientemente de que la acción endógena del factor IGF-I haya sido bloqueada (C,D,G,H). De este análisis no se puede concluir que exista diferencia entre la expresión de *Neuro D* y de *Neuro M*, ni cuando se añade IGF-I exógeno ni cuando se bloquea el IGF-I endógeno. Debido a que ni la expresión de los genes proneurales ni la delaminación de los neuroblastos epiteliales parece estar afectada por la adición o el bloqueo de IGF-I, se deduce que no existe implicación del factor en la especificación de la competencia neural aunque no se puede descartar definitivamente esta idea.

Para asegurar que efectivamente el IGF-I no está implicado en estos eventos tempranos sería necesario probar otro tipo de aproximación experimental y observar lo que ocurre con la expresión de los genes *Neuro D* y *Neuro M* en ratones nulos para *Igf1*.

3.2 Implicación del IGF-I en la proliferación, la supervivencia celular y el mantenimiento del fenotipo neural.

Para estudiar los efectos del IGF-I en la proliferación. Supervivencia y mantenimiento del fenotipo neuronal se analizó la expresión de PCNA, *Islet1/2* y G4 en los explantes de vesículas óticas tratados con los bloqueantes de la acción del IGF-I endógeno. La Figura 17 muestra que la inhibición de la actividad de IGF-I produjo una alteración del patrón de marcadores respecto a la condición control, OS, que se muestra mediante microfotografías (A y B) y resumido en un esquema (C) en el que se localiza la expresión de *Islet1/2* proximal a la zona neurogénica y la de G4 distal. Incubando las vesículas óticas en presencia de los bloqueantes del IGF-I, la expresión de *Islet1/2* se mantiene en la parte proximal a la zona de delaminación pero el número de células

Islet1/2 positivas se redujo visiblemente (rojo en D). El mismo efecto se observa en el caso de las células PCNA positivas (rojo en E), lo que indica que tanto la proliferación celular como la diferenciación de los neuroblastos se ha reducido o incluso detenido tras el bloqueo del IGF-I endógeno. La expresión de G4 tras el bloqueo (verde en D y E) permaneció en la parte distal del CVG, aunque también estaba reducida respecto a la condición control, OS (verde en A y B). Estos resultados sugieren que el IGF-I está implicado positivamente en la proliferación de los neuroblastos ganglionares (PCNA) y en el mantenimiento del fenotipo neuronal (Islet1/2, Tuj1 y G4).

La adición de IGF-I exógeno a las vesículas previamente tratadas durante 24 horas con JB1, rescata la expresión de los marcadores de proliferación (PH3) y de diferenciación (Tuj1 y G4). Esto se representa en la Figura 18 donde se comparan los explantes cultivados 48 horas en medio definido (A-C) con los cultivados 24 horas con JB1 y otras 24 horas con medio definido (D-F) y se observa que se produce una reducción en el número de células que expresan PH3, Tuj1 y G4. Si estas dos condiciones se comparan con los explantes cultivados 24 horas con JB1 y otras 24 con IGF-I exógeno (G-I) se observa que la adición de IGF-I exógeno produce un aumento del número de células proliferativas (PH3) (rojo en H e I) y una recuperación de la expresión de Tuj1 en las células proximales al epitelio neurogénico (verde en H e I), y de G4 en las distales (verde en G) respecto a las expresiones en D-F. En esta última condición los niveles de expresión de los marcadores se asemejan a la condición control sin bloqueo de IGF-I. Estos resultados muestran que se ha producido un rescate del fenotipo neuronal, aunque la recuperación de los niveles de expresión de los marcadores de proliferación y diferenciación, a los de la condición OS (A-C) se produce sólo de manera parcial. Estos resultados confirman la importancia del factor IGF-I en los procesos de proliferación celular y mantenimiento del fenotipo neural.

Figuras

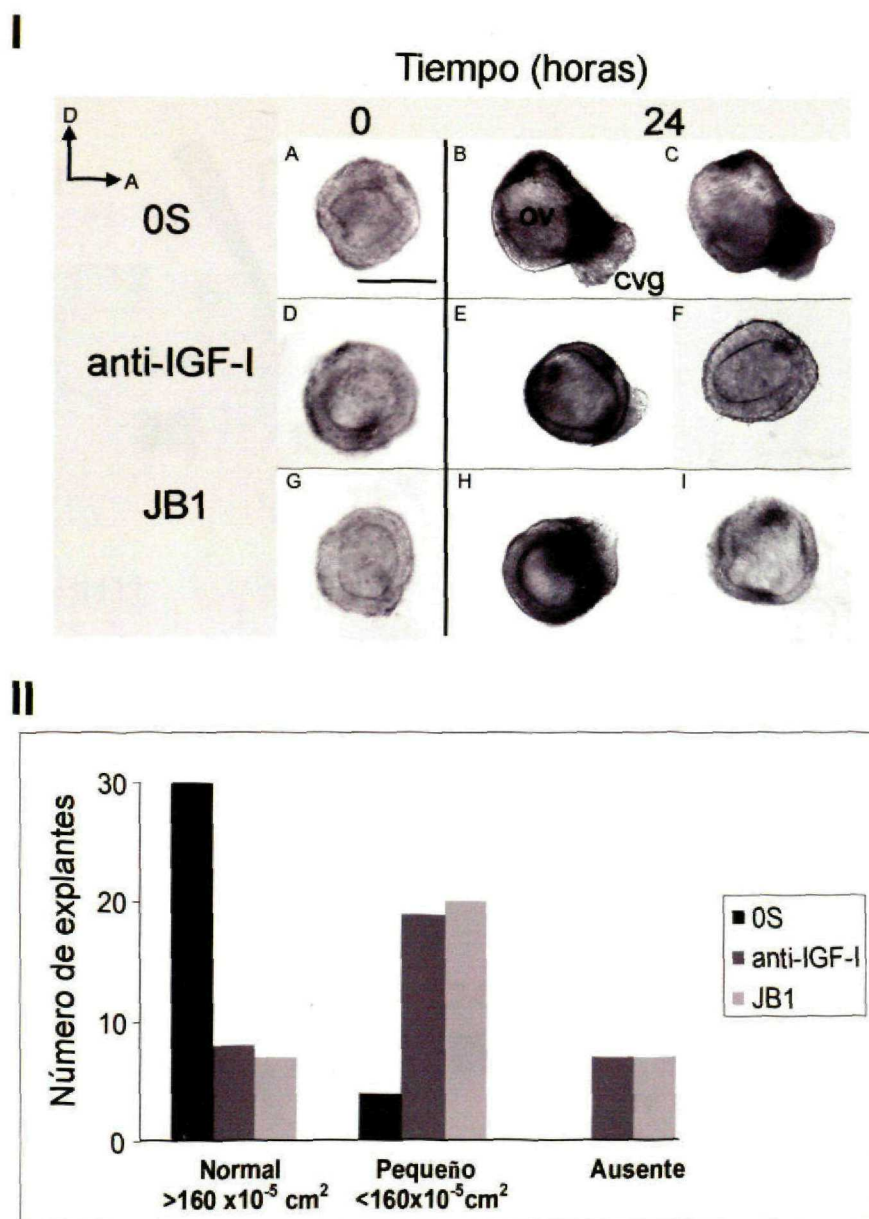


Figura 6. El bloqueo de la actividad del IGF-I endógeno inhibe la formación del CVG. En la parte superior (I) se muestran microfotografías representativas de 34 explantes de vesículas óticas de embriones de estadio HH18 por condición. A, D y G representa las vesículas recién aisladas, lo que se considera tiempo 0 de cultivo y las siguientes son las vesículas cultivadas durante 24 horas, en ausencia de suero (B y C) en las que se generó un CVG de aspecto normal, en presencia del anticuerpo anti-IGF-I (1/100) (E y F), en las que el CVG que se generó era menor (E) que en la condición OS o ausente (F) y en presencia del péptido competidor, JB1 (20 $\mu\text{g/ml}$) (G-I), al igual que en la condición anterior el CVG era menor (H) o ausente (I). Barra, 150 μm ; cvg, ganglio cócleo-vestibular; ov, vesícula ótica. En la parte inferior (II) se muestra la representación en barras del análisis del tamaño del CVG. En ordenadas se representa el número de explantes y en abcisas el tamaño de los CVGs que se agrupan en: normales, pequeños o ausentes, tomando como referencia la moda del área de los 34 explantes, que es $160 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$ medido tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

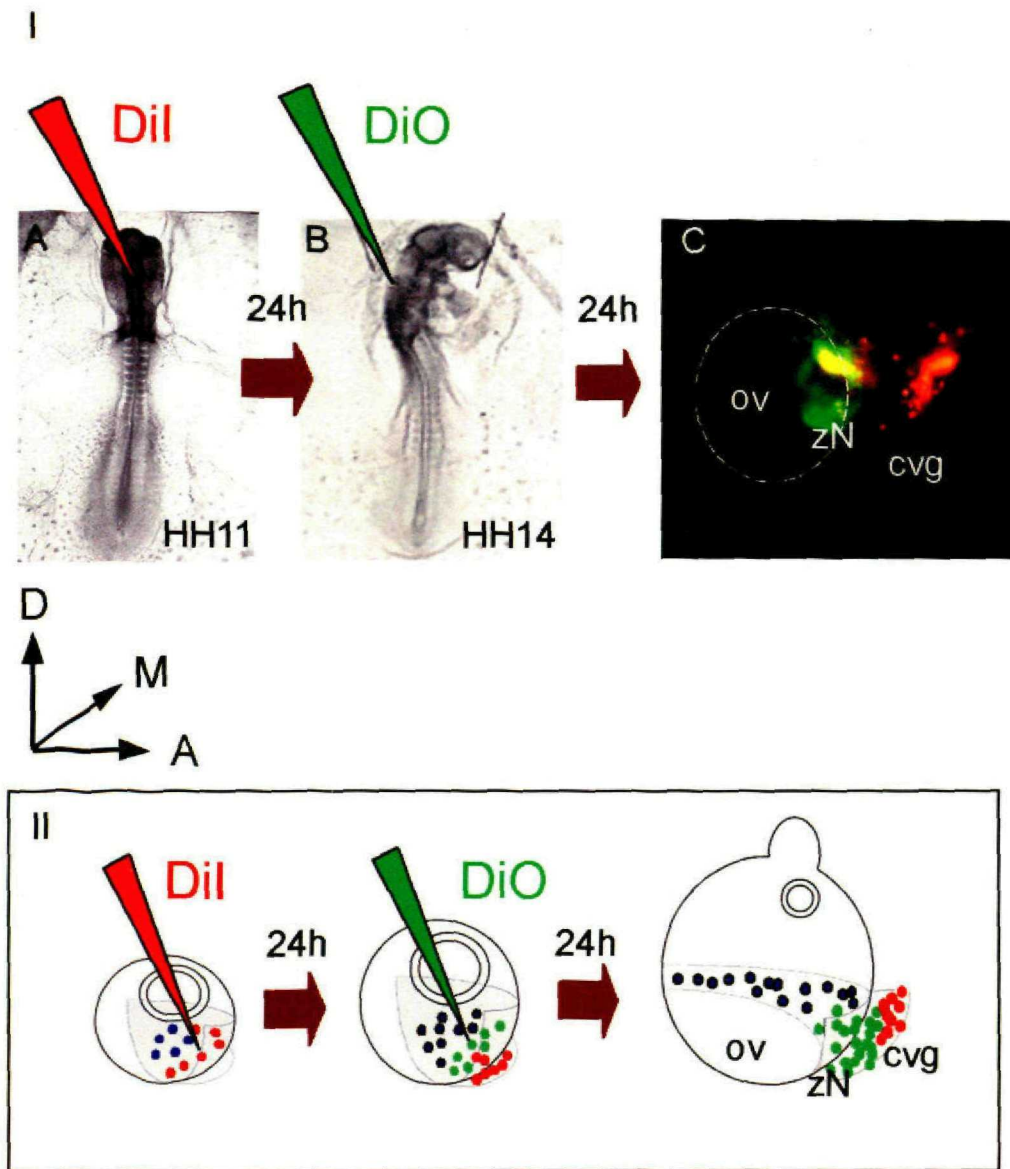


Figura 7. La delaminación de los neuroblastos epiteliales es constante y secuencial. En la parte superior de la figura (I, A-C) se muestran 2 microfotografías de los embriones en los estadios en los que se les aplican los trazadores celulares (HH11 y HH14) y una tercera microfotografía de fluorescencia del aspecto de la zona ótica transcurridas 48 horas de incubación en donde se ven los dos colores segregados. Se muestra un embrión representativo de 4 embriones pinchados.

En la parte inferior (II) se muestra un esquema resumen del resultado de estos experimentos de trazadores celulares sobre las vesículas óticas. Los puntos rojos corresponden a aquellas células que internalizan el primer trazador que es el rojo (Dil) y los verdes las que internalizan el segundo trazador verde (DiO) y las azules el resto de neuroblastos que no han captado ninguno de los dos trazadores. cvg, ganglio cócleo-vestibular; ov, vesícula ótica; zN, zona neurogénica.

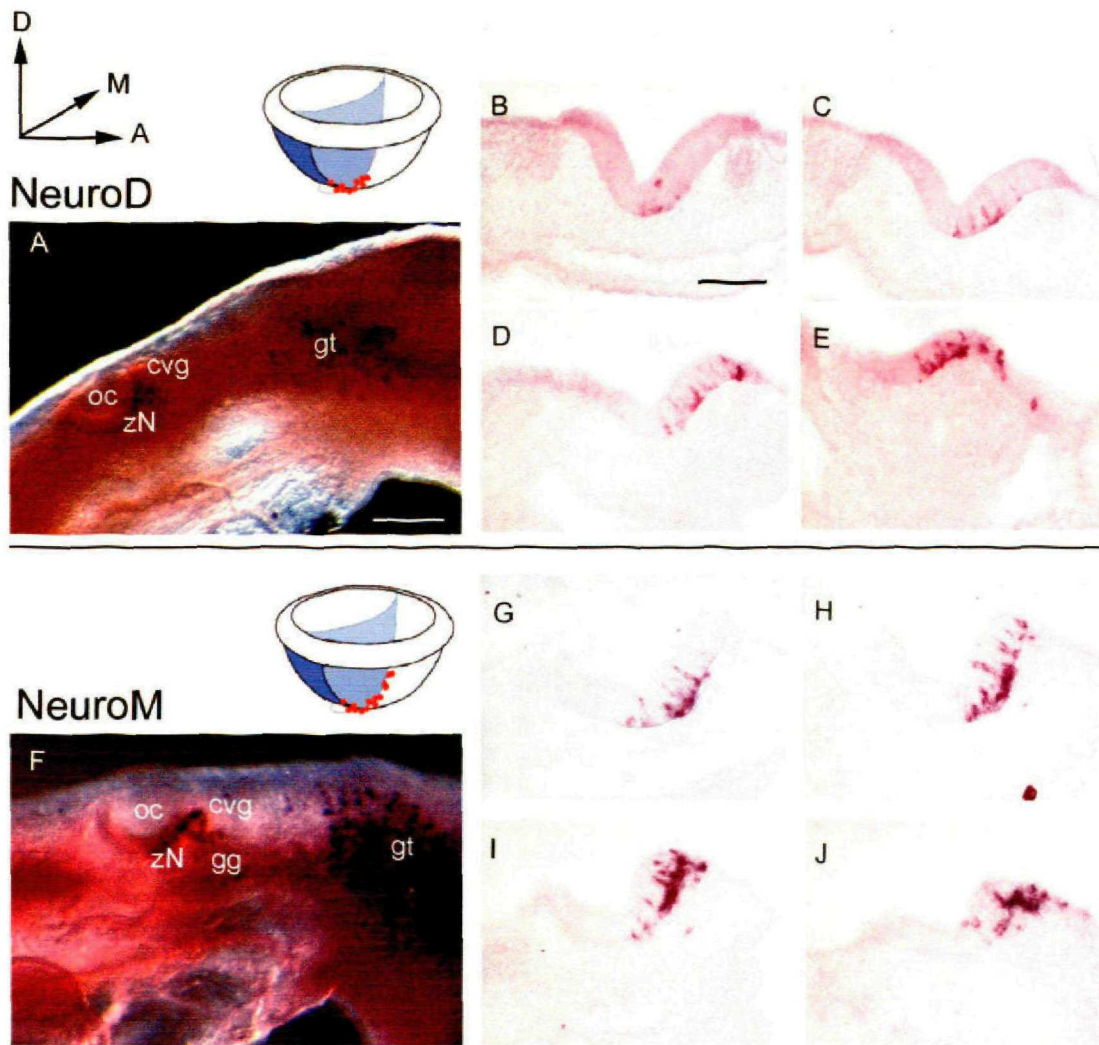


Figura 8. La expresión de Neuro D y Neuro M comienza en la copa ótica en el estadio HH14 de desarrollo. Microfotografías que muestran embriones enteros sobre los que se ha hecho hibridación *in situ* de Neuro D y Neuro M (A, F respectivamente). En ambos paneles se ven marcados unos pocos neuroblastos que formarán el CVG así como en otros ganglios craneales, el trigémino y el geniculado. A la derecha (B-J) se muestran secciones consecutivas de 20 µm obtenidas tras las de hibridaciones *in situ in toto* de Neuro D (B-E) y Neuro M (G-J). En la parte superior a los paneles A y F se muestra un esquema de la expresión de estos dos genes tempranos. Barra en A y F, 200 µm, B-E, G-J, 100 µm. cvg, ganglio cócleo-vestibular; gg, ganglio geniculado; oc, copa ótica; gt, ganglio trigémino; zN, zona neurogénica. A, anterior; M, medial; D, dorsal. Se realizaron 2 experimentos con 5 embriones por condición.

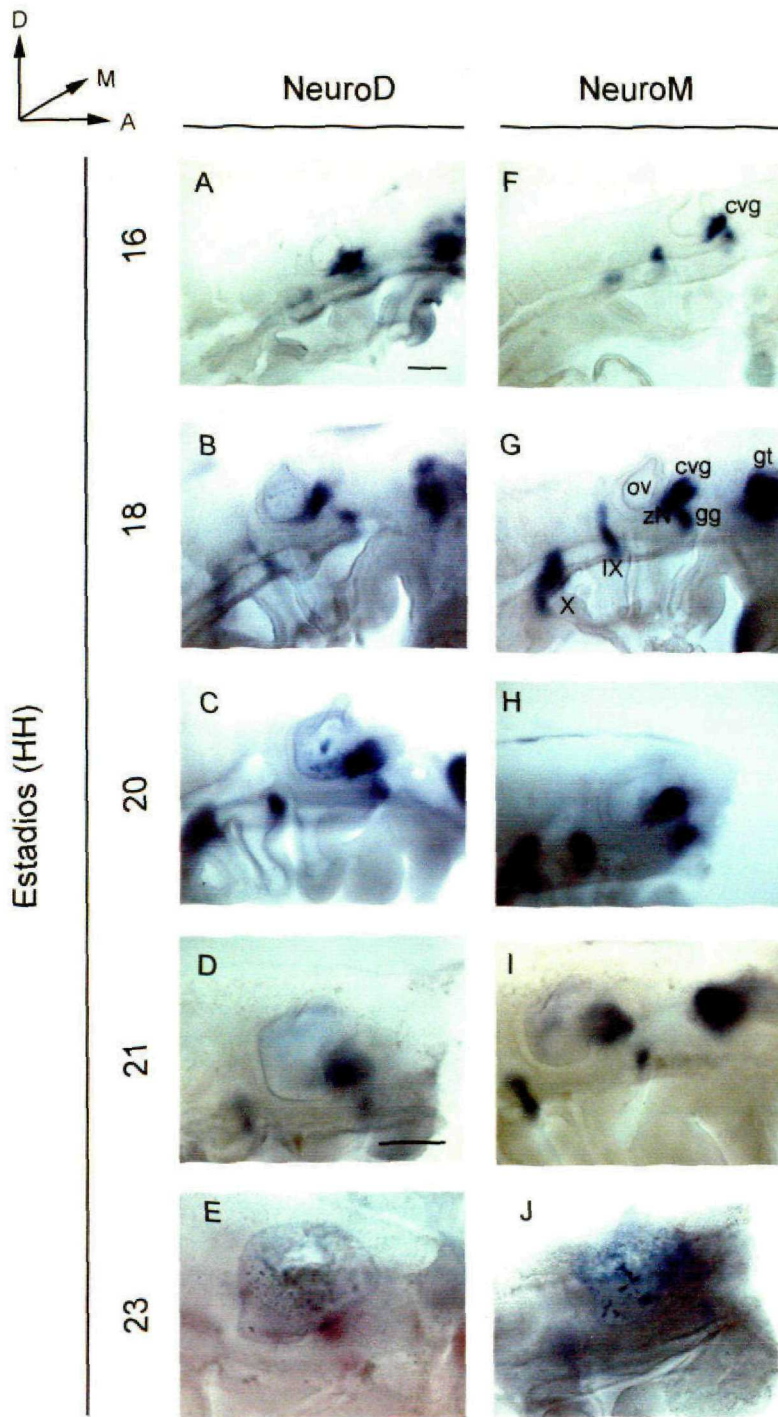


Figura 9. Neuro D y Neuro M se expresan en diferentes estadios embrionarios en la zona neurogénica de la OV y en el CVG. Microfotografías de hibridaciones *in situ* en embriones enteros cuyo estadio se indica en la parte izquierda de los paneles. La primera columna (A-E) muestra la hibridación con la sonda correspondiente al gen Neuro D y la segunda (F-I) muestra la hibridación *in situ* de Neuro M. En los paneles E y J se observa que el CVG se adentra hacia la zona medial, perdiéndose el marcaje en el campo de visión. Barra A-C y F-H, 200 μ m; D-E y I-J, 250 μ m. A, anterior; M, medial; D, dorsal; cvg, ganglio cócleo-vestibular; gg, ganglio geniculado; gt, ganglio trigémino; IX, ganglio craneal noveno; X, ganglio craneal décimo; zN, zona neurogénica.

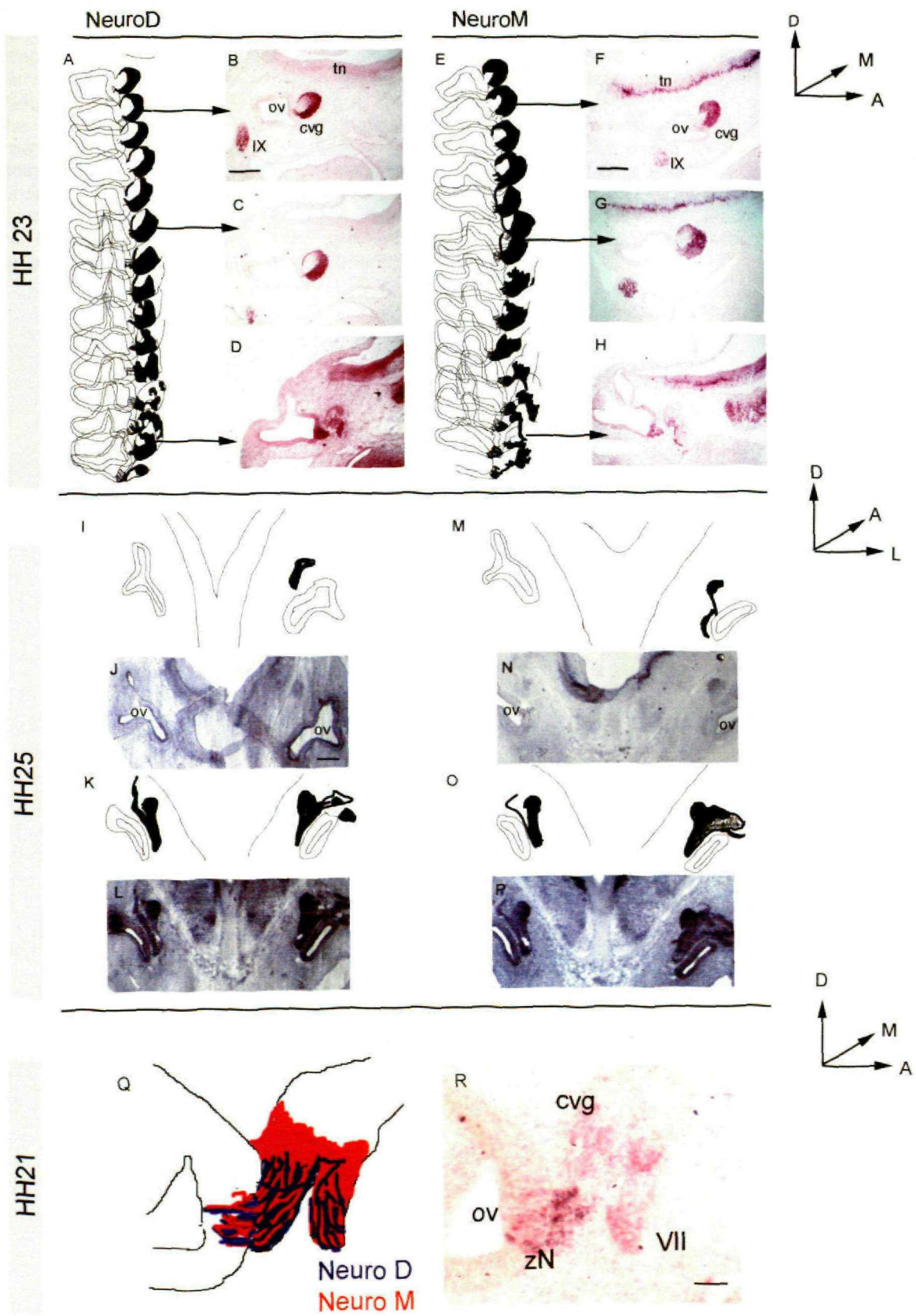


Figura 10. La expresión de Neuro D y de Neuro M mantienen unos patrones similares a lo largo del desarrollo de la OV y su CVG sin apreciarse dominios diferentes de expresión en el epitelio neurogénico. Dibujos de crio secciones sagitales que representan la expresión de Neuro D (A) y Neuro M (E) en estadio HH23 en cortes consecutivos de la parte medial a la lateral. Microfotografías de la expresión de Neuro D (B-D) y de Neuro M (F-H) que corresponden a las secciones que están señalados con una flecha. Dibujos de crio secciones horizontales en embriones de estadio HH25 (I, K, M y O) y sus correspondientes microfotografías (J, L, N y P) mostrando la expresión de Neuro D y Neuro M en estos estadios. Dibujo esquemático de la expresión de Neuro D y Neuro M en una sección de OV y CVG de un embrión de pollo HH21 (Q). Microfotografía de la crio sección sagital dibujada, sobre las que se ha realizado una hibridación *in situ* doble con las sondas de estudio Neuro D (azul) y Neuro M (roja). Barra A-H, 100 µm; I-P, 150 µm; Q y R, 50 µm. ov, vesícula ótica; cvg, ganglio cóclea-vestibular; tn, tubo neural, IX, ganglio noveno; A, anterior; D, dorsal; L, lateral; M, medial.

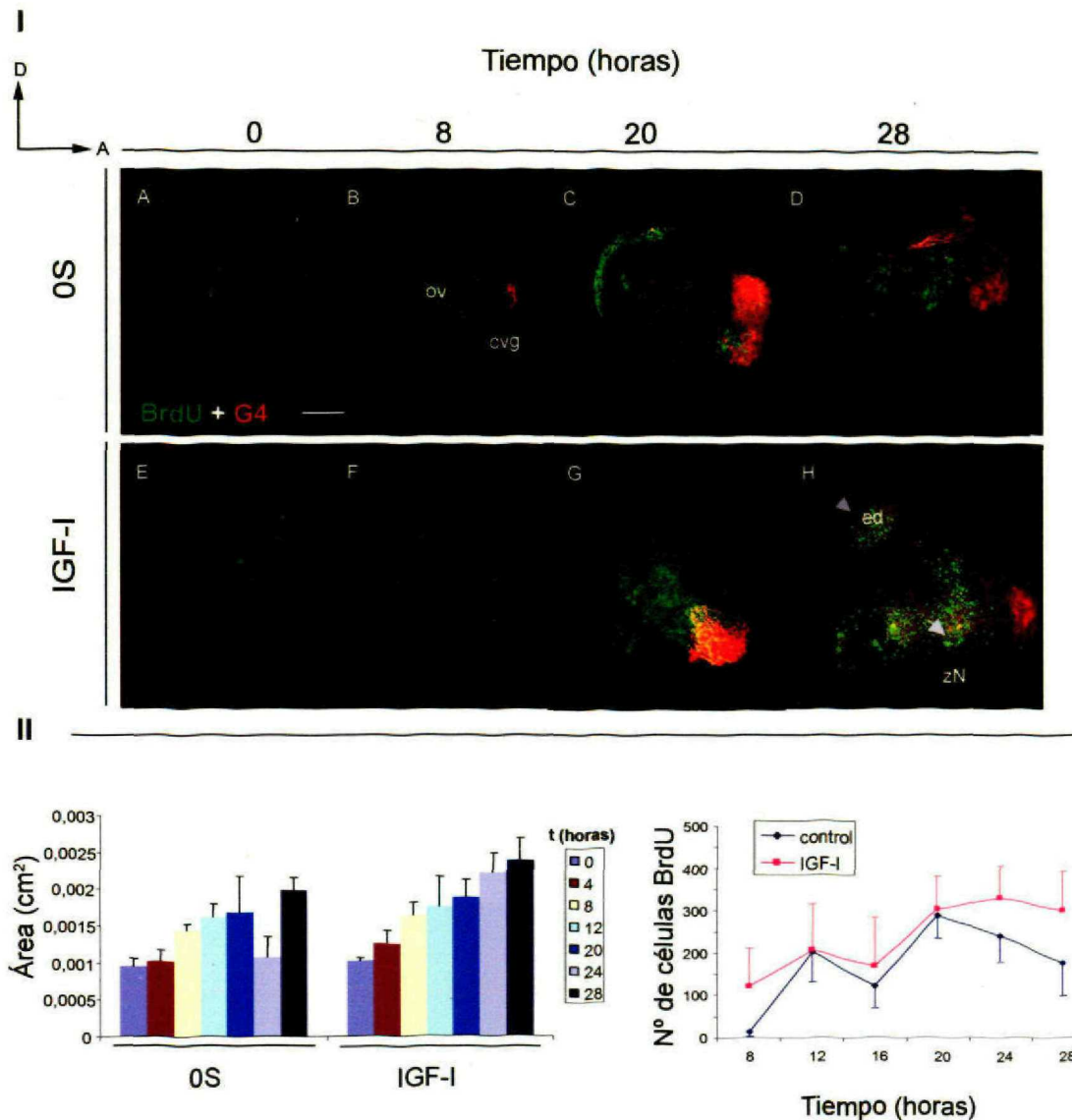


Figura 11. El IGF-I aumenta la proliferación celular. En la parte superior (I) se muestran microfotografías de inmunohistoquímicas dobles que localizan las células que han incorporado BrdU (verde) (3,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y los neuroblastos ganglionares que expresan G4 (rojo). A-D corresponden a explantes cultivados en medio definido, E-H son cultivos con IGF-I exógeno (10 nM). Las horas de cultivo de los explantes se indica en la parte superior. A las 28 horas de cultivo en presencia de IGF-I las células proliferan más en dos zonas concretas (H, puntas de flecha) que corresponden a la formación del conducto endolinfático y a la zona neurogénica. Barra, 160 μm . cvg, ganglio cócleo-vestibular; ed, conducto endolinfático; ov, vesícula ótica; zN, zona neurogénica. Se muestran ejemplos representativos de 3 experimentos en los que se han utilizado al menos 4 explantes por condición y tiempo. En la parte inferior (II) se muestra el histograma de los tamaños de los explantes a los diferentes tiempos de incubación con y sin IGF-I exógeno. A la derecha se muestra el perfil de la proliferación correspondiente al número de células BrdU positivas, en las dos condiciones con y sin IGF-I. En las dos representaciones se utilizan los datos de la media y la desviación estándar de al menos 3 explantes por condición.

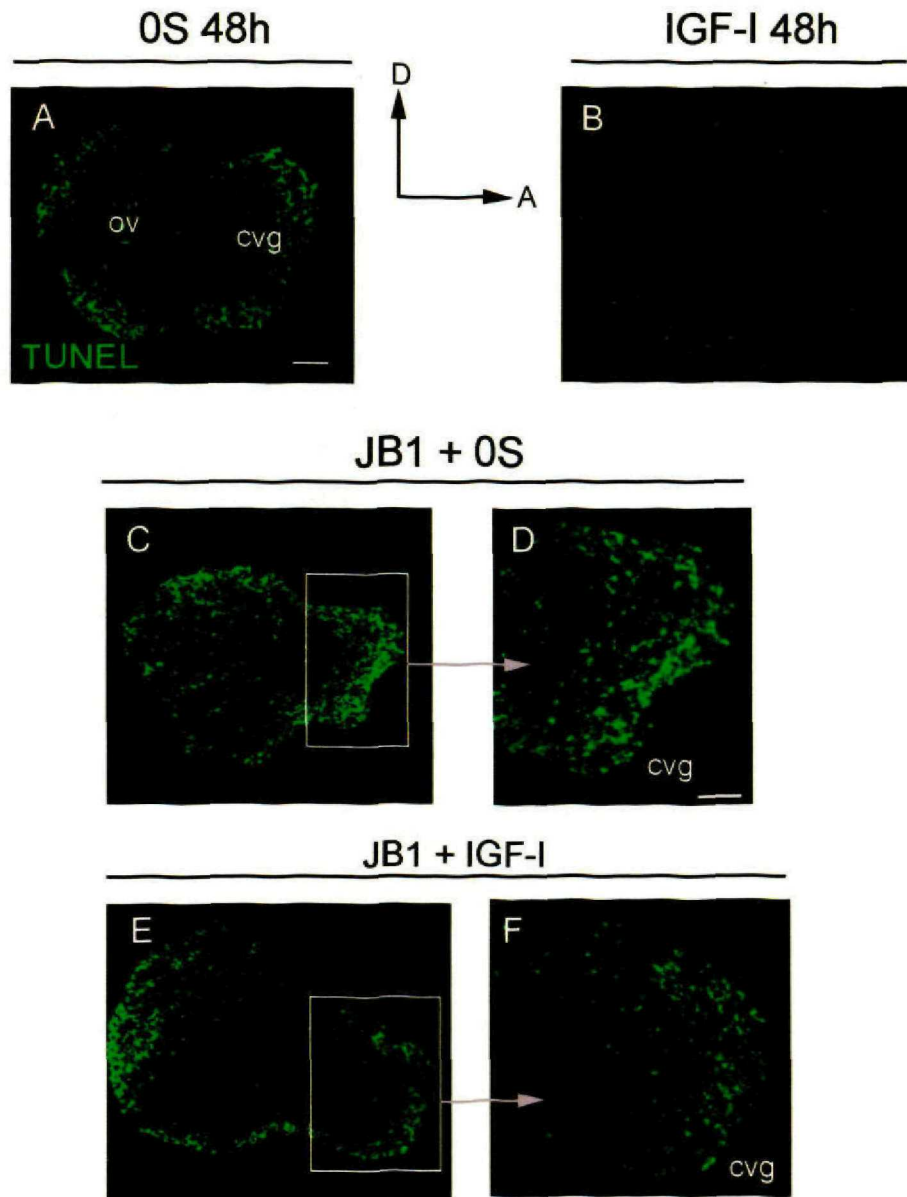


Figura 12. El IGF-I promueve la supervivencia celular. Microfotografías de explantes de vesículas óticas aisladas en estadio HH18 en cultivo en las que se localizan las células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL. Los explantes fueron cultivados en medio sin suero durante 48 horas (A), con IGF-I exógeno durante 48 horas (B), con el péptido competidor JB1 durante 24 horas y otras 24 horas con el medio OS (C,D) se aprecia un mayor número de células apoptóticas que en la condición OS. Tras bloquear el factor IGF-I endógeno durante las primeras 24 horas con JB1 y añadir el IGF-I exógeno (E,F) se observa un menor número de células apoptóticas que en la situación anterior. D y F son detalles del CVG tomados de C y E, respectivamente. Barra (A, B, C y E), 80 μ m; (D y F) 40 μ m. cvg, ganglio cócleo-vestibular; ov, vesícula ótica; A, anterior; D, dorsal.

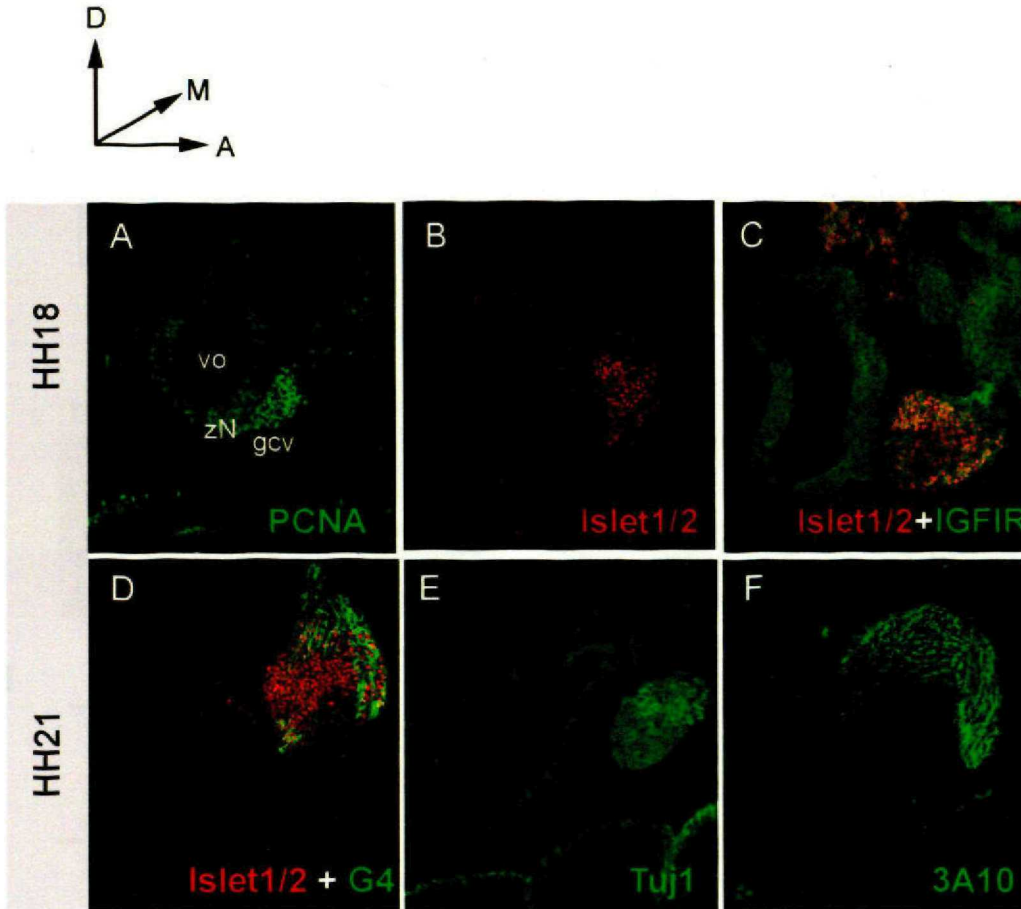


Figura 13. La proliferación y diferenciación neuronal en el CVG sigue un patrón próximo-distal respecto a la vesícula óptica. Criosecciones sagitales de 20 μ m de embriones de pollo en estadios HH18 (A-C) y 21 (D-F) excepto el panel F que es coronal. El antígeno asociado a la proliferación PCNA (A, verde) se expresa en la parte ventral-anterior del epitelio y en el ganglio en la parte proximal al epitelio de la vesícula. Islet 1/2 (B-D, rojo) se expresa en el CVG en el estadio 18 en la parte proximal a la vesícula óptica y en el estadio 21 en la región intermedia del CVG. Doble marcaje de Islet 1/2 (C, rojo) e IGFR (C, verde), los puntos amarillos indican colocalización. Doble marcaje Islet 1/2 (D: rojo) y G4 (D, verde). La expresión de Tuj-1 aparece asociada con las células del CVG pero no a las del epitelio óptico (E, verde). 3A10 presenta el mismo patrón distal de expresión que G4 (F, verde). cvg, ganglio cócleo-vestibular; ov, vesícula óptica; A, anterior; D, dorsal; M, medial.

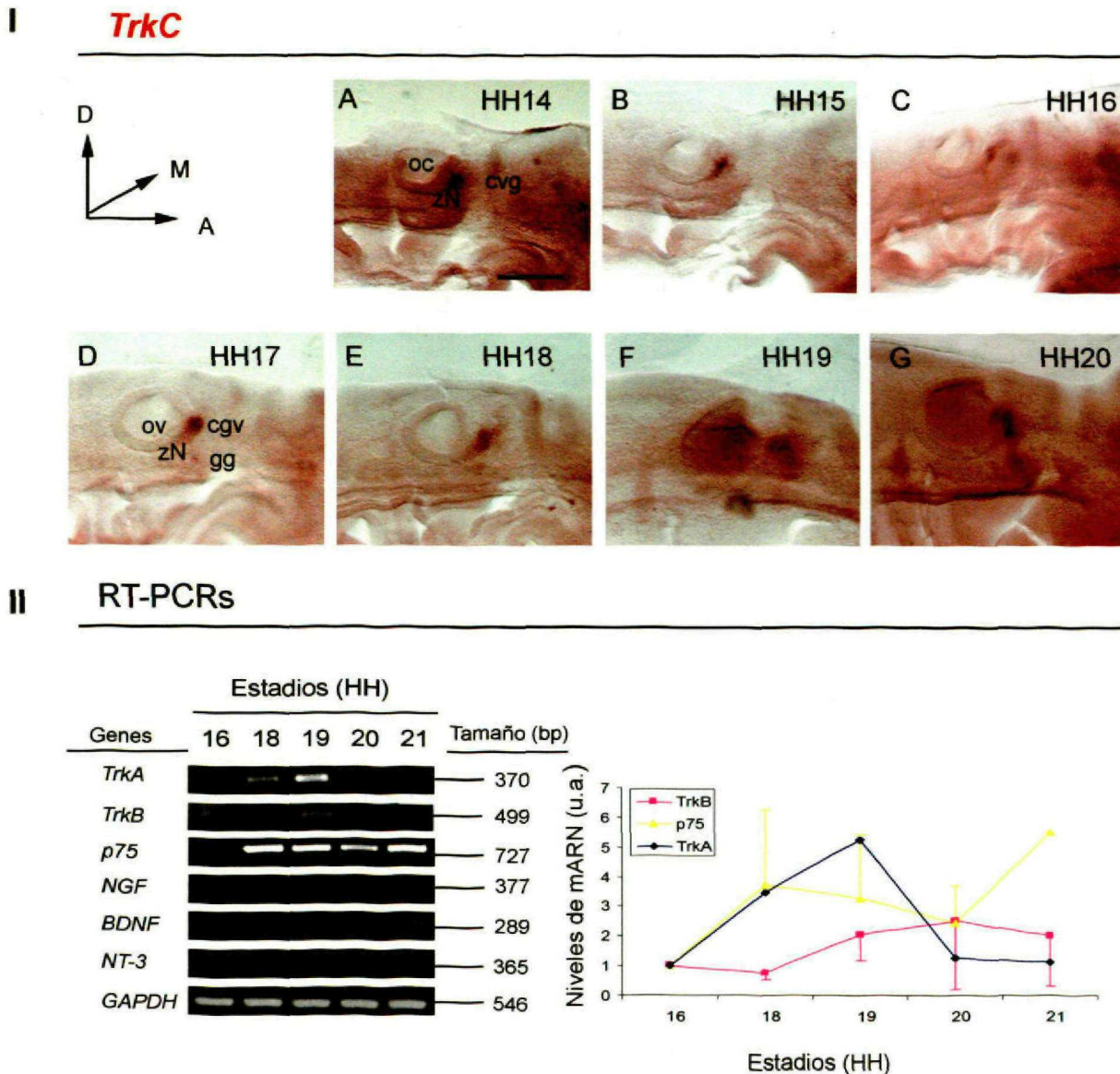


Figura 14. Patrón de expresión de TrkC y detección de la expresión de las neurotrofinas y sus receptores. En la parte superior (I) se muestran microfotografías de hibridaciones *in situ* con la sonda TrkC sobre embriones de pollo enteros. Los paneles van desde el comienzo de la expresión en estadio HH14 (A) y continúa la expresión en todos los paneles hasta el estadio HH20 (G). Las células que expresan TrkC se localizan cada vez más distales a la zona neurogénica. Barra, 250 μ m. cvg, ganglio cócleo-vestibular; gg, ganglio geniculado; oc, copa ótica; ov, vesícula ótica; zN, zona neurogénica. A, anterior; D, dorsal; M, medial. En la parte inferior (II) se muestran fotografías de los geles de agarosa de la expresión de los genes de las neurotrofinas y sus receptores, los tamaños de los fragmentos se anotan a la derecha de los geles. En la gráfica de la derecha se muestra la representación del análisis densitométrico de los geles con el programa ImageJ. Los puntos corresponden a la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes, excepto TrkA que corresponde al densitometrado del gel que se muestra a la izquierda. El gen GAPDH ha sido el escogido como control positivo y control de carga.

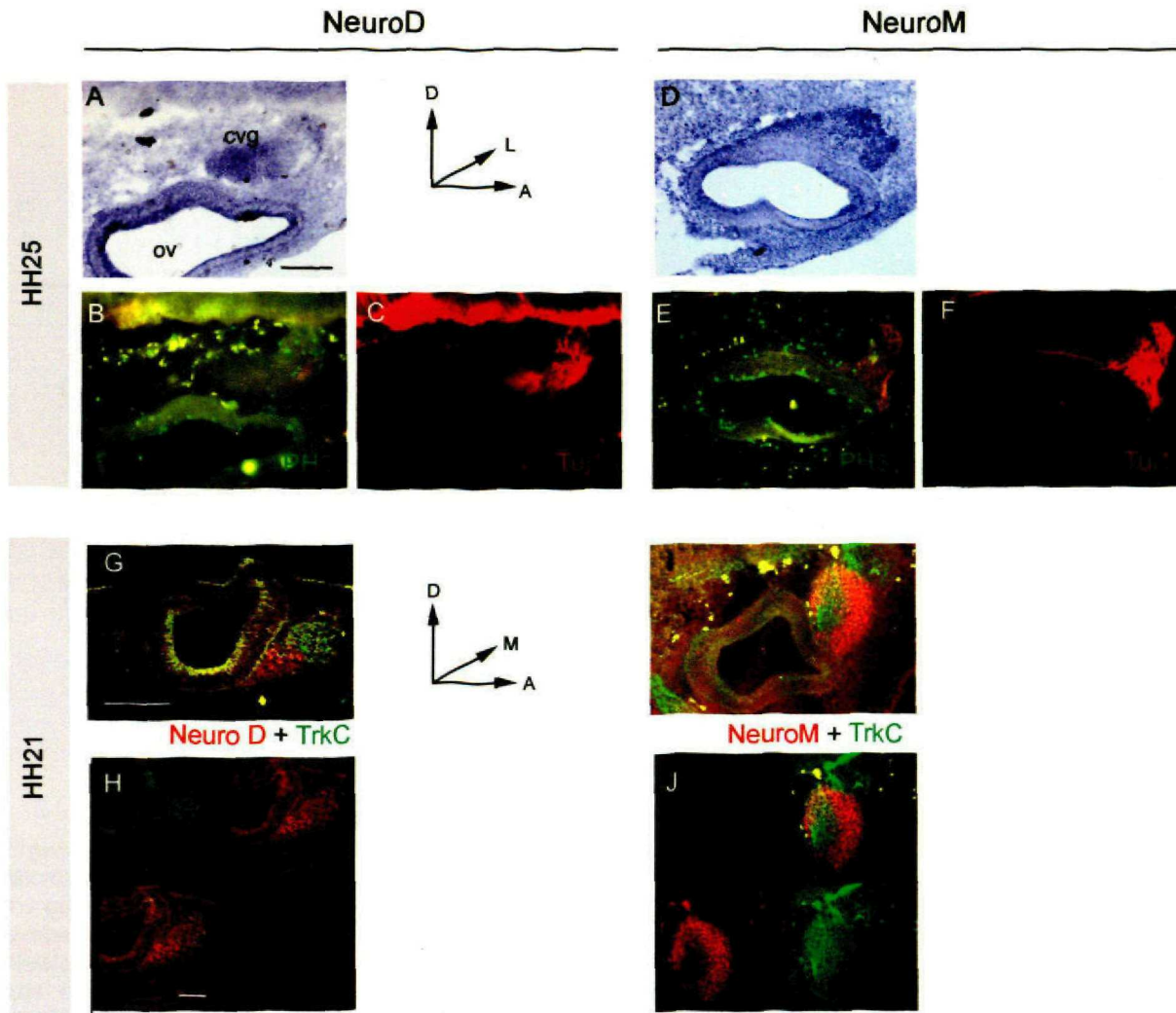


Figura 15. La colocalización de Neuro D y Neuro M con marcadores de proliferación y diferenciación no es total. A-F de la figura muestra criosecciones longitudinales de embriones HH25 a 20µm hibridadas con la sonda NeuroD (A) y Neuro M (D) y combinadas con inmunohistoquímica de fluorescencia de PH3 (B y E) y Tuj1 (C y F). En ambos casos la colocalización de los marcajes no es total. En G y H se muestran criosecciones sagitales de embriones HH21 de hibridaciones in situ de Neuro D (G, rojo) y Neuro M (H, rojo) e inmunohistoquímica de TrkC (G y H, verde) en las que se ve que apenas existe colocalización. Todas las microfotografías son representativas de tres embriones por condición. Barra A-F 150 µm; G e I, 160µm; H y J, 80µm. cvg, ganglio cócleo-vestibular; ov, vesícula ótica; A, anterior, P, posterior, L, lateral, M, medial.

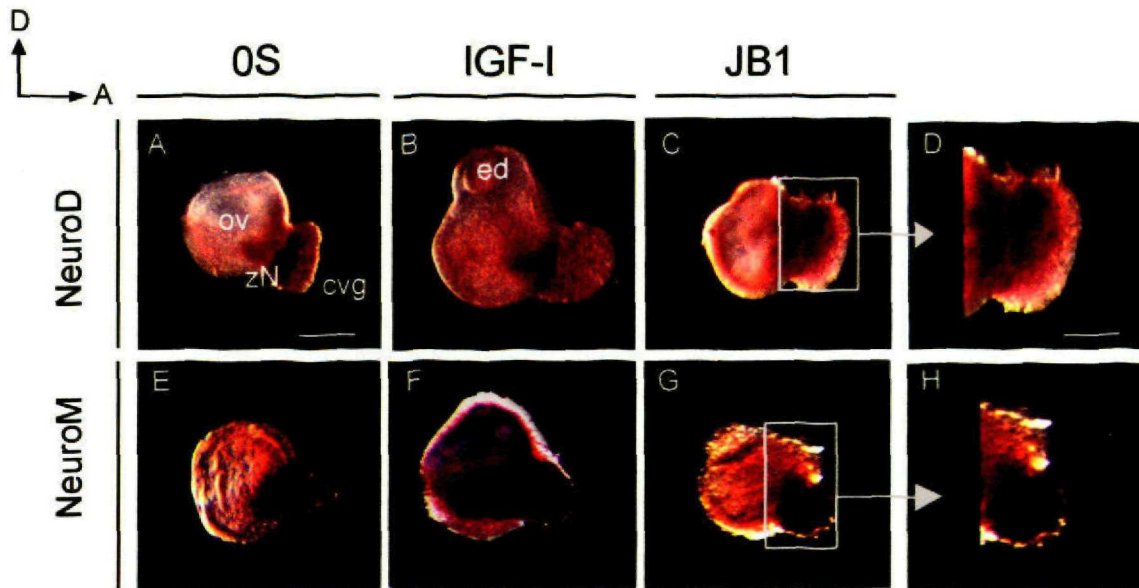


Figura 16. El bloqueo de la actividad del IGF-I no afecta a la delaminación de los neuroblastos. Microfotografías que muestran hibridaciones *in situ* realizadas en los explantes de OV. Los tratamientos a los que fueron sometidas se indican en la parte superior de la figura. La primera fila (A-D) corresponde a explantes hibridados con la sonda de Neuro D y la segunda fila (E-H) a aquellos hibridados con la de Neuro M. En todos los paneles existe expresión de ambos genes. D y H son un detalle del cvg de C y G. Los explantes cultivados en presencia de IGF-I exógeno (B,F) son más grandes y con signos de morfogénesis. Barra 250 μ m (A-C, E-G), 125 μ m (D y H). cvg, ganglio cócleo-vestibular; ed, conducto endolinfático; ov, vesícula ótica. A, anterior; D, dorsal.

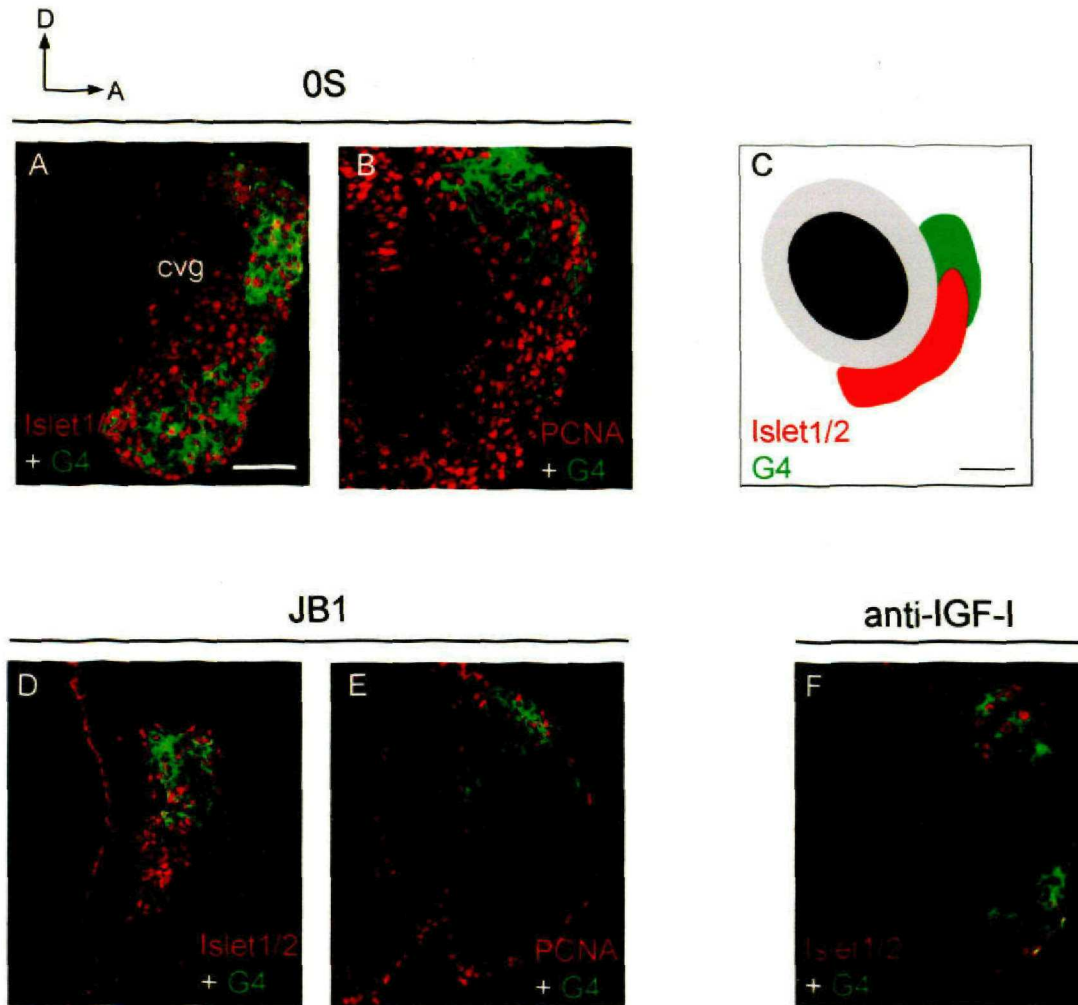


Figura 17. El bloqueo de la actividad del IGF-I endógeno reduce los niveles de proliferación y modifica los patrones de expresión de los marcadores neuronales. Se muestran microfotografías de explantes de vesículas óticas aisladas en estadio HH18 e incubadas 24 horas en ausencia de suero, 0S (A,B), en presencia de JB1 (20 µg/ml) (D,E) o anti-IGF-I (1/100) (F). La expresión de los marcadores fue menor cuando se bloqueó el IGF-I endógeno (D-F). Los paneles muestran la expresión de G4 (verde), Islet 1/2 (rojo) y PCNA (rojo). El panel C es un esquema que muestra el patrón de expresión de los diferentes marcadores en el CVG en medio 0S sin aditivos. Las microfotografías son representativas de tres experimentos diferentes. Barra A, B, D-F, 50 µm; C, 150 µm. cvg, ganglio cócleo-vestibular. A, anterior; D, dorsal.

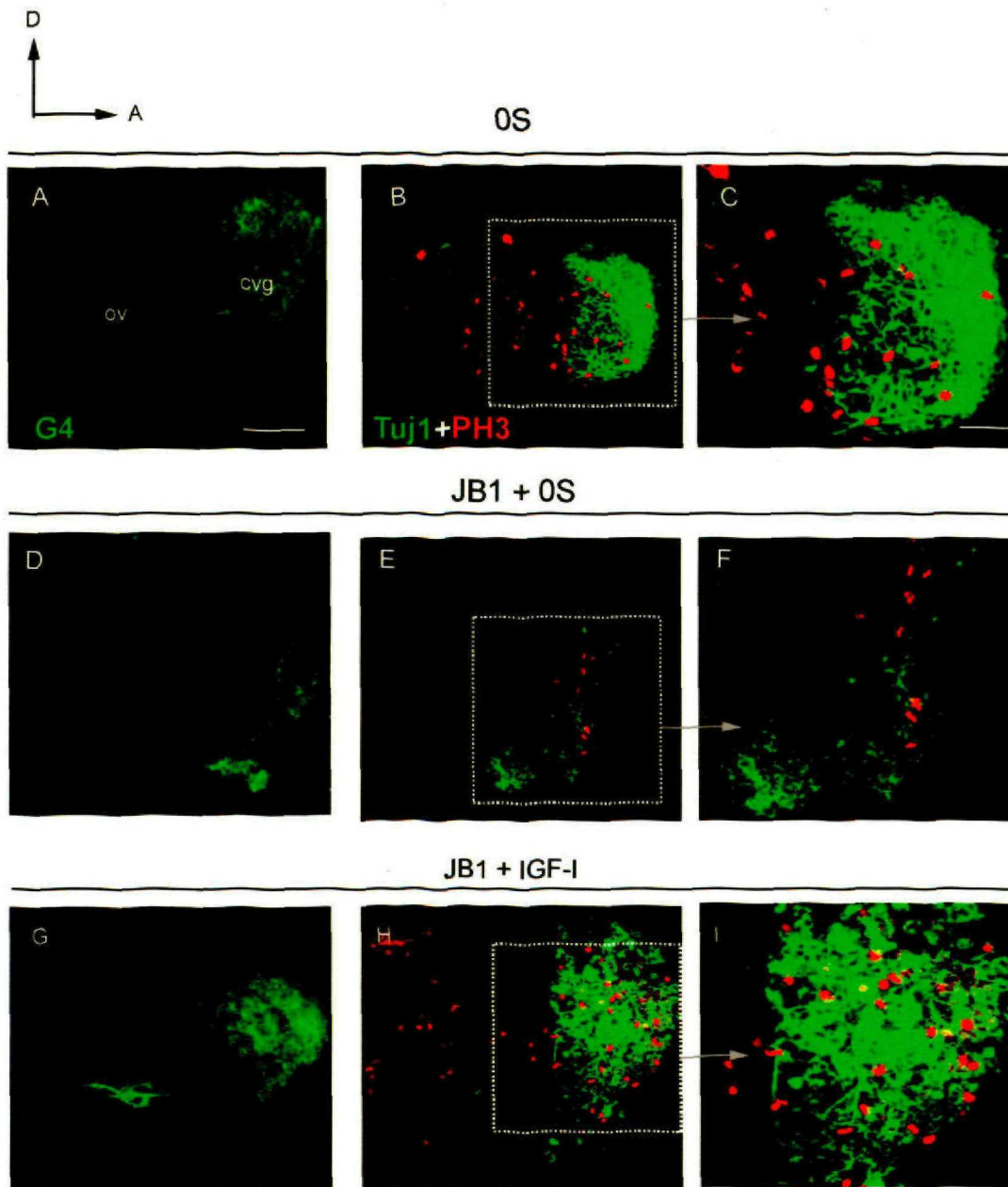


Figura 18. El IGF-I exógeno rescata el fenotipo neuronal y la proliferación celular. Las OV se aíslan en estadio HH18 y se incuban 24 horas en ausencia de suero 0S (A-C), o en presencia de JB1 (D-I). Transcurridas 24 horas se lavan 2 horas con PBS y se incuban otras 24 horas en medio fresco sin suero (A-F) o en medio al que se le ha añadido el factor IGF-I (10 nM), (G-I). Mediante inmunohistoquímica analizamos la expresión de G4 (A, D, G), Tuj-1 (verde) y PH3 (rojo) (B, C, E, F, H, I). Las microfotografías son representativas de cuatro experimentos diferentes. Barra A, B, D, E, G y H, 100 μ m; C, F e I, 50 μ m; cvg, ganglio cócleo-vestibular; ov, vesícula ótica; A, anterior; D, dorsal.

Discusión

DISCUSIÓN

1. La neurogénesis del CVG es un proceso secuencial.

Las neuronas que conforman el CVG derivan de la placoda ótica, de una zona del epitelio ótico que ha adquirido competencia neural, la zona neurogénica (zN), determinada por la expresión de distintos genes neurogénicos y proneurales. Las células delaminan desde esa zona neurogénica y se convierten en neuroblastos ganglionares que proliferan y se diferencian a neuronas maduras con dos identidades diferenciadas: la coclear y la vestibular, según si los órganos sensoriales que van a inervar pertenecen a la parte coclear o vestibular respectivamente.

1.1 La delaminación de los neuroblastos epiteliales es un proceso constante y secuencial.

Estudios previos habían descrito con detalle el periodo de delaminación de los neuroblastos en la zona neurogénica. Gracias a estos trabajos se sabe que la delaminación comienza en estadios HH12-13, tiene un momento de máxima migración en los estadios HH16-17, que continúa hasta el estadio HH21 (D'Amico-Martel y Noden, 1983; Hemond y Morest, 1991). Mediante la microinyección de trazadores celulares en los neuroblastos que se encuentran en la zona neurogénica se quiso profundizar en el estudio de la delaminación, con el objetivo de determinar donde se van situando los neuroblastos que van a formar el CVG y de esta manera poder relacionar la expresión de marcadores de diferenciación neuronal con el proceso de delaminación. De la administración del trazador rojo (Dil) en diferentes estadios desde HH11 hasta HH18 se observó a las 24 horas que en todos los casos se había producido un desplazamiento de las células así marcadas hacia el CVG. El recorrido de las células en esta dirección no era muy amplio sino que se limitaba a posiciones contiguas al área en el que se había administrado el trazador. Esto supone que la delaminación de los neuroblastos se da en todos y cada uno de estos estadios y se puede decir que la delaminación es constante.

Cuando además se inyectó un segundo trazador que marca las células con otro color en la misma zona que el anterior y se analizaron los resultados tras otras 24 horas, se comprobó que ambos colorantes apenas se colocalizaban, con lo cual se puede asumir que los neuroblastos que migran por la zona neurogénica no se localizan de manera arbitraria, sino que se van colocando ordenadamente en el CVG. La forma en que se colocaban consiste en que aquellos neuroblastos que han delaminado antes ocupan a posiciones más distales, mientras que los que

migran después se colocan de manera proximal. Estos datos pueden sugerir que existen dos poblaciones neuronales diferenciadas en el epitelio ótico que especifican las identidades coclear y vestibular, tal y como se ha visto en ratón (Lawoko-Kerali y cols., 2004). Para confirmarlo se deberían administrar trazadores en lugares independientes y bien definidos de la zona neurogénica y de esta manera seguir la trayectoria de las células que migran de cada uno de los territorios. En este momento esta aproximación no es posible ya que no están definidos esos dos lugares que confieren identidades diferentes coclear y vestibular. Estudios en pollo de linajes realizados con vectores retrovirales defectivos para la replicación que infectan células y se mantienen en sus hijas. De esta manera se infectaron neuroblastos epiteliales y se realizó un seguimiento de estas células una vez que el CVG se había segregado en los dos ganglios. Los datos no fueron determinantes ya que existían neuronas cuya descendencia había ido a formar parte de uno sólo de los ganglios pero también se encontraron otras cuya progenie era tanto coclear como vestibular. Lo que este abordaje sugiere que en la zona neurogénica no existe una clara compartimentación coclear y vestibular (Sato y Fekete, 2005).

1.2 Genes relacionados con la adquisición de la competencia neural.

Los principales genes implicados en la determinación y en la selección de precursores neurales son los genes neurogénicos y proneurales. *Ngn1* y *Dll1* son los primeros genes que se expresan en la placoda ótica, definiendo en el epitelio ótico la región neuro-sensorial de donde surgirán tanto las neuronas óticas como los órganos sensoriales (Adam y cols., 1998; Abu-Elmagd y cols., 2001; Alsina y cols., 2004). En los embriones de pollo, en estos primeros estadios, HH12-13, los neuroblastos que se concentran en la zona neurogénica empiezan a delaminar para formar el CVG. En estos estadios no se detecta la expresión de los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M*, empezándose a detectar en el estadio HH14. El hecho de que coincida el comienzo de la expresión de estos genes con la delaminación de los neuroblastos sugiere que ambos genes son importantes para la correcta migración celular. En embriones de ratón que carecen del gen *Neuro D* se ha comprobado que la delaminación es aberrante y que se produce una apoptosis masiva en aquellos neuroblastos que deberían delaminar (Liu y cols., 2000; Kim y cols., 2001). Además en estos estadios de delaminación el patrón de expresión de *Neuro M* es más amplio y su localización es más distal a la zona neurogénica que la expresión de *Neuro D*. Esto sugiere que la expresión de *Neuro M* en los neuroblastos epiteliales precede a la expresión de *Neuro D*. Además, en estudios realizados en ratón se había observado esto mismo en otras estructuras como la médula espinal y en el *tectum* óptico (Roztocil y cols., 1997). Cuando se analizó la expresión en el pollo en estadios más avanzados del desarrollo, se observó que los neuroblastos ganglionares expresan ambos genes y se comprobó que se mantenía la

misma tendencia con los neuroblastos más distales a la zona neurogénica, que expresaban *Neuro M*. La expresión de *Neuro D* se veía siempre más restringida a la parte proximal de la vesícula ótica. Otra evidencia que refuerza esta observación es que otros ganglios como son el IX o el X, que maduran después del CVG expresan *Neuro M* en los estadios HH16-17, antes que *Neuro D* que se observa en HH18-19. En estadios del desarrollo más avanzados esta pequeña diferencia en los patrones de expresión no es tan evidente. Llega un momento en el que ambas expresiones prácticamente se igualan aunque mantienen diferencias sutiles, coincidiendo con la transición de los neuroblastos ganglionares a precursores neuronales inmaduros que pronto llegarán a neuronas funcionales.

Estudios previos habían demostrado que los genes proneurales de vertebrados además de actuar en la determinación del destino neural y en la diferenciación confieren identidades neuronales que hacen que se generen distintos tipos neuronales (Brunet y Ghysen, 1999). Por tanto, a la vista de los patrones de expresión diferencial de *Neuro D* y *Neuro M* en los estadios tempranos se pensó que podrían existir dos dominios en el epitelio ótico especificados para ser coclear o vestibular. Esto también podría ser una explicación de que el dominio de expresión de *Neuro M* sea más distal, coincidiendo con la disposición del ganglio vestibular, ya que aportaría la identidad de neuronas vestibulares que se ha descrito que son las que maduran antes (D'Amico-Martel, 1982). Sin embargo, cuando se analizaron las secciones seriadas de embriones de cinco días de incubación (HH25-27) en los que ya están diferenciadas las zonas cocleares de las vestibulares se comprobó que existía expresión tanto de *Neuro D* como de *Neuro M* en ambos ganglios. Estos resultados descartan que la función de estos dos genes proneurales en el desarrollo del oído fuera la de conferir identidad coclear frente a vestibular. La función más probable es la de permitir la correcta delaminación de los neuroblastos epiteliales y contribuir a la supervivencia y la diferenciación de estos hasta convertirse en neuronas funcionales, tanto cocleares como vestibulares. El hecho de que coexistan ambos genes no parece que sea porque uno ejerza un efecto compensatorio sobre el otro, ya que estudios en ratones deficientes en cada uno de estos genes por separado y en dobles mutantes para ambos genes describen que su fenotipo es el mismo. Es probable que en este momento del desarrollo las funciones de ambos genes sean redundantes y sean necesarias en la especificación de los distintos tipos neuronales una vez que las neuronas se hayan diferenciado como ocurre con los precursores de las neuronas motoras que requieren de *Neuro D* y de factores con homeodominio LIM para convertirse en neuronas motoras maduras (Lee y Pfaff, 2003).

1.3 La proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular.

Una vez que los neuroblastos han migrado comienzan su proliferación y diferenciación. Esto se comprobó mediante marcadores de proliferación y neuronales. Lo que se observó con el análisis de la expresión de estos marcadores es que existía un patrón de expresión tanto temporal como secuencial (Figura 20).

Estudios previos habían descrito que el final de la migración se produce en el estadio HH21 y que una vez que las células delaminan es cuando proliferan y se hacen posmitóticas (D'Amico-Martel y Noden, 1983; Hemond y Morest, 1991). En este trabajo se detecta expresión de los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M* en los neuroblastos epiteliales al menos hasta el estadio HH23. La expresión de *Neuro D* ha sido descrito exclusivamente en células postmitóticas (Bertrand y cols., 2002; Chae y cols., 2004) mientras que *Neuro M* se expresa en células en división (Roztocil y cols., 1997). Si esto es así se podría entonces confirmar la existencia de células postmitóticas en el epitelio ótico de pollo migrando para formar el CVG o bien, la existencia de un conjunto de células con competencia neuronal que se mantiene en el epitelio ótico. Así, en estadio HH18 se observa cómo la región positiva para el antígeno de proliferación PCNA es la proximal a la zona neurogénica y coincide con la región de expresión de los genes proneurales. Al analizar los dobles marcajes de *Neuro D* y *Neuro M* junto con otro marcador de proliferación PH3 también se comprueba que colocalizan las mismas áreas. El análisis de las inmunohistoquímicas realizadas tras la incorporación de BrdU en explantes de vesículas óticas muestra que existe proliferación en el CVG en zonas que se corresponden a los dominios *Neuro D* y *Neuro M* positivas. Sin embargo, una explicación más probable es que el desarrollo del oído interno de pollo aún exista delaminación en estadios más avanzados a HH21 y que *Neuro D* no se expresa únicamente en aquellas células que son postmitóticas sino que, tal y como se propone para *Neuro M*, lo que este sucediendo es que pone en marcha las vías necesarias para una inminente salida de ciclo (Roztocil y cols., 1997).

En cuanto a la supervivencia celular se conoce que en el desarrollo del oído interno, como en el caso de la mayoría de las estructuras en desarrollo, es necesario un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular programada, para que el número de células final sea el apropiado. La apoptosis es además un fenómeno característico de regiones con una intensa actividad de crecimiento, migración e invaginación como es el caso de las copas ótica y óptica, los arcos branquiales o la región anterior del tubo neural (Hensey y Gautier, 1997; Varela-Nieto y cols., 2003; León y cols., 2004). En experimentos llevados a cabo *in vitro* en explantes de vesículas óticas se ha descrito la existencia de células apoptóticas en regiones concretas del epitelio ótico que coinciden con eventos morfogénicos y neurogénicos (Frago y cols., 1998 y 2003). Estudios previos realizados en el laboratorio habían descrito este patrón de apoptosis *in*

vivo (Sanz y cols., 1999a). Durante la formación del CVG la apoptosis se localiza en la pared ventromedial, zona por donde están migrando los neuroblastos y en la pared posterior del CVG donde se está produciendo la primera ola de diferenciación. Estos resultados apoyan el papel de la apoptosis en la regulación del tamaño final del CVG controlando el número de células que migran y que forman el CVG.

En el lapso de tiempo que existe entre el final de la migración y la conversión de los neuroblastos en posmitóticos, los neuroblastos ganglionares coexpresan marcadores de proliferación junto con los primeros marcadores propios de neuroblastos ganglionares, Islet 1/2 o Tuj1. La expresión de Islet 1/2 comienza en estadios tempranos, HH12, cuando comienza la delaminación (Li y cols., 2004). En este trabajo, se analiza su expresión y la de Tuj1 a partir de HH18, mostrando que se expresan en la parte proximal al epitelio ótico y según avanza el desarrollo la expresión se produce en neuroblastos que se colocan más distales a la zN. La comparación de la expresión de los marcadores de los neuroblastos ganglionares Islet 1/2 y Tuj1, con la de los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M*, muestra que existe coexpresión en las zonas centrales del CVG pero no en otras zonas de modo que los neuroblastos inmaduros más proximales a la zona neurogénica sólo expresan *Neuro D* y *Neuro M* y los más distales expresan sólo Tuj1. Aunque no se tiene información de esta coexpresión en estadios del desarrollo anteriores a HH21, probablemente exista una mayor coexpresión entre ellos.

Los neuroblastos continúan su diferenciación y se convierten en precursores neuronales inmaduros que dejan de proliferar y comienzan a expresar otros marcadores propios de precursores que se están preparando para iniciar las conexiones neuronales como son G4, 3A10 o TrkC. La expresión de estos marcadores de diferenciación es distal a la zona neurogénica. Aunque en las zonas intermedias del CVG coexisten con los marcadores neuronales más inmaduros, el dominio distal al que llega su expresión es único. Se ha analizado en detalle el patrón realizado mediante hibridación *in situ* de TrkC. Cabe destacar que su expresión comienza en estadios muy tempranos de copa ótica, HH14. La función que realiza en estos primeros momentos no está documentada pero lo que está claro es que desde el estadio HH14-20 su expresión es continuada. Desde el principio se localiza en los neuroblastos ganglionares y no en los epiteliales, y según avanzan los estadios se localiza en posiciones más distales al epitelio. Aunque en este trabajo el análisis concluyó en estadio HH20 se sabe que la expresión persiste en el tiempo, ya que hay estudios en los que se describe que su máximo de expresión se alcanza en E5-E8 (Pirvola y cols., 1997). Además mediante RT-PCR se ha visto que existe expresión de los demás receptores de neurotrofinas de alta afinidad: *TrkA*, *TrkB*, del receptor de baja afinidad p75, así como de las neurotrofinas que se unen a estos receptores que son: NGF, BDNF y NT-3. Estudios realizados en el laboratorio habían descrito la expresión de p75 en la vesícula ótica a partir de HH18 en dos parches del epitelio ótico y en la zona distal del CVG, de

TrkA en el CVG entre HH17-20, de NGF en parches en el epitelio ótico en HH19 y HH20 (Frago y cols., 2003). La descripción de la expresión de BDNF y NT-3 en la parte coclear del oído interno del embrión de pollo presenta alguna diferencia con la de los mamíferos. Una de las diferencias es que la neurotrofina predominante en esta estructura es BDNF, mientras que, en mamíferos se había visto que era NT-3 (Pirvola y cols., 1997). También se había visto que en explantes de CVGs estas dos neurotrofinas promueven la supervivencia y estimulan la neuritogénesis (Avila y cols., 1993; Represa y cols., 1993). Todo esto sugiere que tanto las neurotrofinas como sus receptores desempeñan un papel en la diferenciación final de los precursores neuronales además de su función principal de mantener las conexiones neuronales.

Puesto que se había descrito una expresión diferenciada de TrkB y TrkC en las neuronas del ganglio coclear y vestibular se pensó que podrían ayudar a identificarlas (Pirvola y cols., 1997). Además los ratones deficientes en *Neuro D* presentan bajos niveles de ambos receptores (Kim y cols., 2001), por lo que se podía retomar la idea de que los genes proneurales que se expresan en los neuroblastos epiteliales, además de conferir identidad neuronal, conferirían identidad coclear o vestibular. Sin embargo, no se pudieron detectar niveles de TrkB ni por inmunohistoquímica ni por hibridación *in situ* aunque si mediante RT-PCR, pero los niveles que se detectaron mediante esta aproximación son tan bajos que se descartó la idea de que pueda ser un marcador de identidad coclear. También se tuvo en cuenta que los patrones de expresión de los genes proneurales eran casi idénticos en los estadios avanzados, HH23 y HH25, donde ya se diferencian las zonas cocleares y vestibular, por lo que con estos resultados esta hipótesis quedaba descartada.

Si se compara la expresión de TrkC con la de los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M* en el estadio HH21 se ve que coexpresan solamente en una pequeña parte del CVG. Los neuroblastos que expresan TrkC durante el periodo en el que se han estudiado se ve que son los más distales, sin embargo los neuroblastos que están expresando los genes proneurales quedan en posiciones más proximales. Al analizar las imágenes obtenidas de los patrones de expresión de los genes proneurales en secciones sagitales de embriones de estadio HH23 se ve una zona sin expresión que aparece en la parte central del CVG y que coincide con la expresión del marcador de diferenciación, el receptor TrkC, lo cual indica que son neuroblastos más maduros que los que los rodean. Aún no se ha descrito con detalle la trayectoria que siguen los neuroblastos desde que migran al CVG hasta que se colocan en sus posiciones adecuadas según vayan a ser neuronas cocleares o vestibulares, pero posiblemente sea en esta trayectoria donde esté la respuesta de la visión que proporcionan los cortes sagitales del CVG donde se aprecia una zona central que corresponde a neuronas mas diferenciadas que expresan TrkC.

Estas observaciones junto con lo que ya se había deducido de los experimentos de trazadores celulares, sugiere que la posición que los neuroblastos van adquiriendo en el CVG

según delaminan no es arbitraria y proporcionaría indicios de que a lo largo de la proliferación y la diferenciación de los neuroblastos ganglionares hasta neuronas funcionales existen unos patrones secuenciales bien determinados y fundamentales para que todo se produzca de manera correcta. En la Figura 19 se muestra un esquema de esta secuencia de expresión de los marcadores en estadio HH21.

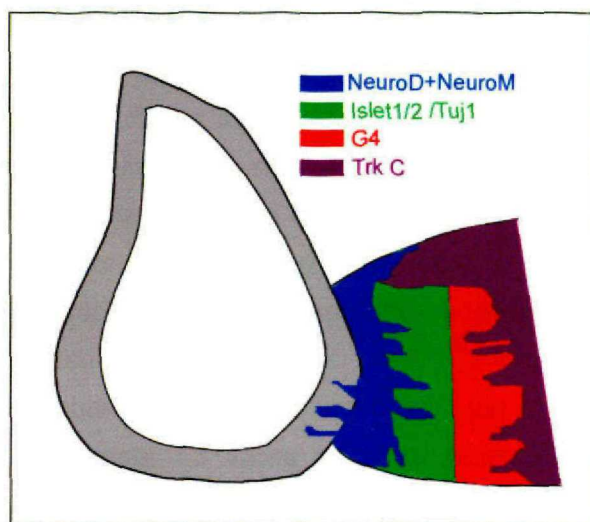


Figura 19. Esquema de la secuencia de expresión de los marcadores. Dibujo esquemático de la secuencia de los genes proneurales y los marcadores de diferenciación de los neuroblastos ganglionares Islet, Tuj1, G4 y TrkC recogiendo los resultados del análisis de las secciones que se han presentado a lo largo de este trabajo. Corresponde a una visión sagital de una vesícula ótica y su CVG de estadio HH21.

2. El IGF-I participa en la generación del CVG.

El número final de neuronas que van a formar el CVG depende de un balance correcto entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Este balance se modula por factores de transcripción y de crecimiento. Entre los factores de crecimiento más influyentes está la familia de la insulina. Estos factores se sintetizan localmente en muchos tejidos durante el desarrollo y tienen funciones autocrinas y paracrin. En este trabajo se ha puesto especial interés en uno de los miembros de este sistema el IGF-I. Se ha visto que durante el desarrollo del oído interno del pollo existe expresión, tanto en el epitelio ótico como en el CVG, del factor IGF-I y de su receptor de alta afinidad (IGF1R) (Camarero y cols., 2003). Las funciones principales que se le han asignado durante el desarrollo del sistema nervioso incluyen el control del tamaño celular, la estimulación de la proliferación y la supervivencia celular, el incremento de la diferenciación celular, la correcta formación de axones, la correcta mielinización y la modulación de la sinaptogénesis y de la neurotransmisión (Varela-Nieto y cols., 2003). Esto junto con el hecho de

que una deficiencia en este gen en humanos provoca sordera neurosensorial (Woods y cols., 1996 y 1997) fue lo que hizo interesante el estudio de la implicación de este factor en la neurogénesis del CVG en el pollo.

La primera aproximación que se llevó a cabo fue sobre explantes de vesículas óticas en cultivo, que fue posible gracias al desarrollo autónomo que presenta esta estructura que en cultivo es capaz de generar todos los tipos celulares que la componen incluyendo las neuronas. La cuestión que se planteaba era si el IGF-I era uno de los factores que hacían posible este desarrollo autónomo. Se utilizaron dos maneras de bloquear la acción endógena del IGF-I pero en ambos casos se obtuvieron resultados muy similares. Tras el análisis del bloqueo del IGF-I endógeno se pudo ver como efectivamente este era un buen candidato al mantenimiento de la autonomía ótica. Se observó que las vesículas que se generaban a las 24 horas de haberse producido dicho bloqueo no tenían la misma forma que aquellas en las que existía IGF-I. El epitelio seguía siendo homogéneo y no existían indicios de la formación del conducto endolinfático indicando un retraso en la morfogénesis. Los CVGs eran más pequeños, incluso en algunos explantes no se formaban. Midiendo los tamaños de los explantes con y sin IGF-I se comprobó que realmente eran hasta 1,5 veces menores. Además se tenía el resultado de explantes a los que en vez de bloquear la acción endógena del IGF-I se había añadido IGF-I y se había incorporado BrdU para estudiar la proliferación celular. Del aspecto de los explantes en cultivo se deduce que a estos explantes les cuesta más tiempo generar el CVG que aquellos sin nada añadido pero tienen mayor número de células proliferando y mantienen la morfogénesis que se mantiene *in vivo*. Esto sugiere que el IGF-I promueve el crecimiento de las vesículas óticas y que la generación del CVG se retarda. Una vez que el CVG se ha generado tiene un aspecto similar al de los explantes control.

3. Implicación del IGF-I en la neurogénesis del CVG.

Una vez que se había visto que el IGF-I era necesario para la correcta generación del CVG, se quiso saber en detalle en que etapas de la neurogénesis participaba de manera decisiva. Trabajos realizados en el laboratorio habían demostrado la importancia de IGF-I en mamíferos ya que los ratones deficientes en *Igf1* pierden la mayoría de las neuronas auditivas y presentan problemas en la supervivencia, diferenciación y mantenimiento de las células del ganglio coclear debido a que la inervación del órgano de Corti no se produce correctamente (Camarero y cols., 2001 y 2002). También mediante la caracterización de ratones nulos para *Igf1* se observaron cambios en el tamaño del cerebro causados entre otras cosas por cambios en el balance proliferativo de los precursores neuronales (Liu y cols., 1993; Powell-Braxton y cols., 1993). Respecto al pollo se habían realizado diferentes aproximaciones *in vitro* para aclarar los

mecanismos intracelulares por los cuales el IGF-I llevaba a cabo sus funciones. Así, se habían explorado los mecanismos intracelulares responsables de la acción del IGF-I. Se observó que tras la unión del factor IGF-I con el receptor tirosina quinasa de alta afinidad IGF1R se desencadena la activación de varias cascadas de señalización intracelular: se incrementan los niveles del lípido inositol fosfoglicano, se activa la cascada Raf/MAPK y se incrementan los niveles de c-Jun, c-Fos y el antígeno nuclear de proliferación celular PCNA (Leon y cols., 1998; Sanz y cols., 1999a). En paralelo, se activa la vía de Akt/proteína quinasa B, una quinasa que se encarga de controlar la supervivencia celular y que inactiva las vías proapoptóticas ya que bloquea la activación de las caspasas (Frago y cols., 2003; Leon y cols., 2004). Con esta información se quiso estudiar en detalle la implicación que tiene el IGF-I en cada una de las etapas de la neurogénesis del CVG.

3.1 El IGF-I no parece estar implicado en la delaminación.

Los primeros pasos en la neurogénesis del CVG en pollo son la especificación del dominio neural en la placoda ótica y la delaminación de los neuroblastos. Para estudiar la implicación del IGF-I en estos primeros momentos lo que se hizo fue bloquear la actividad endógena del factor y comprobar la expresión de los genes proneurales, *Neuro D* y *Neuro M*, cuya integridad funcional es decisiva en estos primeros pasos (Bertrand y cols., 2002). Por la forma reducida y carente de morfología en el epitelio que adquirirían los explantes en los que la acción del IGF-I era interferida, se confirma que el bloqueo había sido eficaz. Se comprobó que a pesar del bloqueo tanto la expresión de *Neuro D* como la de *Neuro M* permanecían intactas en los neuroblastos ganglionares y en alguno de los epiteliales por lo que se deducía que el IGF-I no debía ser imprescindible ni en la especificación del dominio neural ni en la delaminación de los neuroblastos. Esto no significa que el IGF-I no ejerza ninguna función en la neurogénesis temprana del CVG sino que no es imprescindible ni decisivo. Estudios realizados en pez cebra (*Danio rerio*) han demostrado que la activación de la vía de IGF-I es necesaria para establecer los ejes dorsal-anterior. Existe una expresión muy temprana, desde la gastrulación, tanto de IGF-I como del receptor IGF1R y el bloqueo de la vía de IGF-I estaría afectando a genes que se expresan en el desarrollo del sistema nervioso en este periodo como son *Otx2*, *Rx3*, *FGF8*, *Pax6.2* y *Ntl* (Eivers y cols., 2004). En este mismo trabajo se sugiere además una relación entre las vías de IGF-I con las de FGF8 y la de los BMPs. También se observó que existía una integración de la vía de IGF-II con la de BMPs al estudiar la inducción neural en *Xenopus* (Pera y cols., 2003). Es importante valorar que en el trabajo de Eivers y cols. se utilizaron dominantes negativos que en ocasiones resultan poco selectivos y dan lugar a fenotipos exagerados y que a pesar de que la vía de señalización de IGF-I está conservada evolutivamente se trata de otro

organismo y no de aves pero sí que puede ser un argumento a favor de que el IGF-I puede participar en etapas tempranas de la neurogénesis. También se había descrito que existe una regulación génica de *Neuro D* sobre el gen de la insulina que constituye una diana transcripcional de *Neuro D* ya que su promotor contiene una caja E que es reconocida por *Neuro D* y se une a ella (Kaneto y cols., 2002; Dufton, C. y cols., 2005). IGF-I contiene también la caja E en su promotor lo cual supone un indicio más de que puede existir una regulación de la expresión de IGF-I por parte de los genes proneurales.

En los explantes a los que se había añadido IGF-I exógeno, y tras 24 horas de incubación, presentaban un tamaño mayor que los explantes control y una morfología más diferenciada, ya que se empieza a apreciar la formación del conducto endolinfático. Sin embargo, el CVG no variaba de manera significativa de tamaño y no había alteración en la expresión de los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M*.

Para conseguir un bloqueo más específico del factor y del receptor a nivel génico se diseñaron morfolinós para el IGF1R, *Neuro D* y *Neuro M* con el fin de ver la expresión tras el bloqueo. Estudios previos en el laboratorio habían utilizado los oligos antisense en cultivos organotípicos de vesículas óticas con éxito (Leon y cols., 1995). Si embargo, en esta ocasión no se consiguió un efecto inhibitorio claro por lo que los datos que se obtuvieron no fueron concluyentes. Sólo se puede hipotetizar acerca de lo esperable y es que, según se había descrito en los ratones dobles *knock out* para *Neuro D* y *Neuro M*, parece que no tienen un efecto compensatorio en el oído, por lo que probablemente se vea afectada la delaminación de los neuroblastos en caso de bloquear cualquiera de ellos. Tal vez con esta aproximación si se observaría algún cambio en la expresión de estos genes al bloquear el IGF1R, por lo que esta aproximación está en desarrollo.

3.2 El IGF-I está implicado en la proliferación, supervivencia y diferenciación de los neuroblastos.

El bloqueo de la acción del IGF-I sí altera otras etapas de la neurogénesis. Una vez descritos *in vivo* los patrones de marcadores de proliferación (PCNA, PH3) y diferenciación neuronal (*Islet1/2*, *Tuj1*, *G4*) se analizaron estos mismos patrones en los explantes de vesículas óticas cultivados en medio definido. Lo que mostraba este análisis es que cuando se inhiben las vías activadas por IGF-I hay menos neuroblastos ganglionares proliferando. Lo mismo ocurre con los marcadores de diferenciación. El tipo de aproximación experimental que se ha usado magnifica los efectos de la inhibición de IGF-I, ya que al contrario de lo que puede ocurrir en una situación *in vivo*, la falta de factor no puede ser compensada por otros factores que no sean los segregados por las células epiteliales de las vesículas óticas. Sin embargo, son un buen indicio

general de la función de este factor en los procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación que tienen lugar en la neurogénesis.

Para abordar el estudio de la implicación de IGF-I en la supervivencia celular se utilizó la técnica TUNEL. En la condición control existía una muerte celular programada basal lo cual es lógico al extraer una estructura de su tejido circundante y dejarla incubando 48 horas en ausencia de factores de crecimiento. Cuando se añadió el IGF-I exógeno se vio cómo esta apoptosis disminuía indicando el efecto preventivo del factor. Cuando se bloqueó la acción del IGF-I se produjo un aumento de células muriendo que no fue posible rescatar más que parcialmente al volver a añadir IGF-I exógeno. Posiblemente debido a que muchas de las células que se marcan con esta técnica ya están en un momento irreversible del proceso de muerte celular programada.

Experimentos realizados en el laboratorio en explantes de CVGs descartan la idea de que el IGF-I esté actuando en los neuroblastos indirectamente a través de algún factor derivado del epitelio ótico y también corrobora que la activación de IGF-I se lleva a cabo a través de su receptor de alta afinidad IGF1R. Se realizaron los explantes de ganglios aislándolos así de las señales procedentes del epitelio ótico. En estos explantes, procedentes de embriones de estadio HH19-20, se añadió el factor IGF-I exógeno y se observó mediante *Western blotting* que existía un aumento en los niveles de PCNA y de G4 respecto al control. Estos efectos de proliferación y diferenciación se deben a la unión del IGF-I a su receptor de alta afinidad IGF1R ya que se inhiben al añadir el péptido bloqueante JB1 (Camarero y cols., 2003).

En los explantes de vesículas óticas tras el bloqueo de la actividad del IGF-I endógeno se apreció una reducción del número de células proliferativas. Por otra parte, se analizó la incorporación de BrdU en explantes control y en aquellos con IGF-I exógeno añadido. Al comparar ambas condiciones, además de las diferencias morfológicas que ya se han comentado, existía un aumento en la proliferación de los explantes con el factor IGF-I. Cuantificando las células BrdU positivas no se observaron diferencias significativas posiblemente debido a que la estructura al ser montada con un cubreobjetos se aplana perdiendo la tridimensionalidad e imposibilitando la visión de todas las células que componen la vesícula ótica. En estos mismos explantes se analizó la expresión del antígeno G4. De este modo se observa que en aquellos explantes a los que se añade IGF-I no se existe expresión de G4 hasta las 12 horas de cultivo, mientras que en los controles, OS a las 8 horas ya se expresa. Esta tendencia no continúa ya que una vez que G4 se expresa lo hace en igual medida que en los explantes controles.

También se observaron cambios en los patrones de expresión de marcadores de diferenciación de neuroblastos ganglionares (Islet 1/2 y TuJ1) y de precursores inmaduros (G4) al modificar la acción del IGF-I. Para realizar este estudio se inhibió la actividad del IGF-I

parcialmente ya que una inhibición total de la generación del CVG no hubiese permitido ver resultados en el CVG. Se observó una pérdida de las células que expresan PCNA, PH3, Islet 1/2, Tuj1 y G4 lo que indica que la ausencia de actividad del IGF-I endógeno produce una modificación en los patrones de estos marcadores consecuencia de la alteración en la proliferación de los neuroblastos ganglionares y su diferenciación.

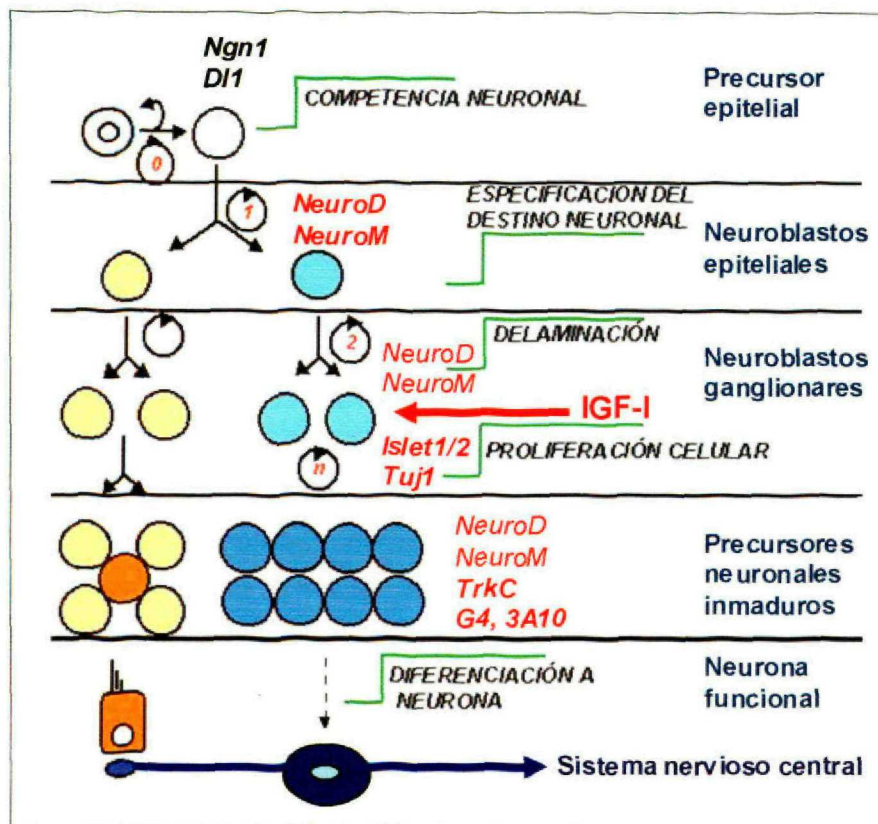


Figura 20. Esquema propuesto de la neurogénesis del CVG. Esquema de la aportación de este trabajo a las distintas etapas de la neurogénesis del CVG. A la izquierda se representan las divisiones celulares que se producen marcando en amarillo aquellas células cuyo destino será llegar a ser células ciliadas y en azul las que finalmente serán neuronas funcionales. Los genes neuronales que se expresan a lo largo de este proceso están en negrita y en rojo los que se han ido estudiando y caracterizando a lo largo del trabajo. En negrita y cursiva figuran los procesos que tienen lugar en cada fase y a la derecha en azul los distintos tipos celulares que se van originando que comienzan con un precursor epitelial en el epitelio ótico que da lugar a los neuroblastos epiteliales que continúan en el epitelio ótico y que una vez que delaminan, en el CVG se denominan neuroblastos ganglionares que tienen capacidad proliferativa y que cuando la pierden y comienzan a expresar marcadores como *TrkC*, *G4* y *3A10* se denominan precursores neuronales inmaduros que terminan convirtiéndose en neuronas funcionales (modificado de Alsina y cols., 2003).

Para asegurar que el efecto observado se debía al IGF-I se analizó que ocurría al volver a añadir el factor exógeno. Lo que en este caso ocurrió es que el patrón tanto de proliferación como de diferenciación se rescataba parcialmente y volvía a reproducirse lo que ocurría en la situación *in vivo*. La recuperación de los patrones de expresión es parcial y no total debido a que hay células demasiado dañadas por la ausencia de actividad del IGF-I que no pueden volver a proliferar y que morirán, o células demasiado maduras que se escapan ya al control del factor.

La implicación de la proliferación y la diferenciación de los tejidos se han estudiado durante el desarrollo de los organismos de distintas especies. Se ha observado la importancia de la regulación del ciclo celular para que dicha proliferación y diferenciación sean correctas. Se ha profundizado en cuestiones como el control del número celular durante la organogénesis, la relación entre el tamaño celular y el ciclo celular, los mecanismos que dirigen el inicio y el final de la división celular y se puede concluir que a pesar de que el ciclo celular es un proceso conservado durante el desarrollo de los organismos se modifica adaptándose a las necesidades de los distintos tejidos y embriones (Levine, 2004). En este trabajo se ha visto la importancia de la proliferación celular y la diferenciación de los neuroblastos para que se produzca la correcta neurogénesis del CVG. Los neuroblastos tienen mecanismos intrínsecos que controlan el ciclo celular, se produce una transición provocada por la expresión de los genes de identidad neural que permiten la salida del ciclo y que continúen la maduración adecuada. Los resultados de este trabajo indican la importancia de la actividad del IGF-I para una adecuada proliferación celular y para el mantenimiento del fenotipo neuronal, pero no permiten saber si el fenotipo neuronal es inducido por las vías que se activan por el IGF-I o es la consecuencia de la regulación del ciclo celular y de una acción permisiva en la que se posibilitan un determinado número de ciclos de división que son los apropiados para que el tamaño de la vesícula ótica y el CVG sea el correcto.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El IGF-I endógeno es necesario para la formación de un CVG de tamaño normal en explantes de vesículas óticas en cultivo.
2. La delaminación de los neuroblastos que van a formar el CVG es un proceso constante y secuencial.
3. Los genes proneurales *Neuro D* y *Neuro M* se expresan en los neuroblastos epiteliales y ganglionares desde la delaminación hasta la diferenciación (HH14-25). En los primeros estadios (HH14-21) la expresión de *Neuro M* es más distal a la zona neurogénica que la de *Neuro D*, lo que podría sugerir una expresión diferencial, coclear o vestibular, sin embargo, los patrones de expresión de *Neuro D* y de *Neuro M* se van igualando y en estadios HH23-25, donde ya están diferenciadas las partes cocleares de las vestibulares se expresan en ambas partes.
4. Existe una colocación parcial de la expresión de los genes proneurales, *Neuro D* y *Neuro M*, que precede a la de los marcadores de diferenciación, *Tuj1* y *TrkC*, que sugiere que los genes proneurales están ayudando en la correcta diferenciación de los neuroblastos.
5. La génesis del CVG en el embrión de pollo se caracteriza por un patrón espacial y temporal de marcadores de proliferación (PCNA y PH3) y diferenciación (*Islet1/2*, *Tuj1* y *G4*) en los neuroblastos ganglionares desde la parte proximal a la zona neurogénica de la OV a la parte distal en el CVG que se modifica cuando se bloquea la acción endógena del IGF-I.
6. El IGF-I no parece ser necesario para la especificación de la competencia neuronal ni para la delaminación de los neuroblastos epiteliales ya que el bloqueo del IGF-I endógeno no afecta a la expresión de *Neuro D* ni de *Neuro M* en los neuroblastos del CVG.
7. El IGF-I es necesario para la neurogénesis del CVG, participa en la regulación de la proliferación y la supervivencia de los neuroblastos y se requiere para la adquisición y mantenimiento del fenotipo neural.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Elmagd, M., Ishii, Y., Cheung, M., Rex, M., Le Rouedec, D. and Scotting, P. J. (2001). "cSox3 expression and neurogenesis in the epibranchial placodes." *Dev Biol* 237(2): 258-69.
- Adam, J., Myat, A., Le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J. (1998). "Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development." *Development* 125(23): 4645-54.
- Adamska, M., Herbrand, H., Adamski, M., Kruger, M., Braun, T. and Bober, E. (2001). "FGFs control the patterning of the inner ear but are not able to induce the full ear program." *Mech Dev* 109(2): 303-13.
- Ajiro, K., Yoda, K., Utsumi, K. and Nishikawa, Y. (1996). "Alteration of cell cycle-dependent histone phosphorylations by okadaic acid. Induction of mitosis-specific H3 phosphorylation and chromatin condensation in mammalian interphase cells." *J Biol Chem* 271(22): 13197-201.
- Ali, M. M., Jayabalan, S., Machnicki, M. and Sohal, G. S. (2003). "Ventrally emigrating neural tube cells migrate into the developing vestibulocochlear nerve and otic vesicle." *Int J Dev Neurosci* 21(4): 199-208.
- Alsina, B., Abello, G., Ulloa, E., Henrique, D., Pujades, C. and Giraldez, F. (2004). "FGF signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo." *Dev Biol* 267(1): 119-34.
- Alsina, B., Giraldez, F. and Varela-Nieto, I. (2003). "Growth factors and early development of otic neurons: interactions between intrinsic and extrinsic signals." *Curr Top Dev Biol* 57: 177-206.
- Alvarez, I. S. and Navascues, J. (1990). "Shaping, invagination, and closure of the chick embryo otic vesicle: scanning electron microscopic and quantitative study." *Anat Rec* 228(3): 315-26.
- Ard, M. D., Morest, D. K. and Hauger, S. H. (1985). "Trophic interactions between the cochleovestibular ganglion of the chick embryo and its synaptic targets in culture." *Neuroscience* 16(1): 151-70.
- Avila, M.A., Varela-Nieto, I., Romero, G., Mato, J.M., Giraldez, F., Van De Water, T.R. & Represa, J. (1993). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 support the survival and neurogenesis response of developing cochleovestibular ganglion neurons". *Dev Biol*, 159, 266-275.
- Baillyes, E. M., Nave, B. T., Soos, M. A., Orr, S. R., Hayward, A. C. and Siddle, K. (1997). "Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting." *Biochem J* 327 (Pt 1): 209-15.
- Baker, C. V. and Bronner-Fraser, M. (2001). "Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction." *Dev Biol* 232(1): 1-61.
- Barrett, G. L. (2000). "The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis." *Prog Neurobiol* 61(2): 205-29.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F. (2002). "Proneural genes and the specification of neural cell types." *Nat Rev Neurosci* 3(7): 517-30.
- Bok, J., Bronner-Fraser, M. and Wu, D. K. (2005). "Role of the hindbrain in dorsoventral but not anteroposterior axial specification of the inner ear." *Development* 132(9): 2115-24.
- Bonapace, G., Concolino, D., Formicola, S. and Strisciuglio, P. (2003). "A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency." *J Med Genet* 40(12): 913-7.
- Bondy, C. A., Werner, H., Roberts, C. T., Jr. and Leroith, D. (1990). "Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression." *Mol Endocrinol* 4(9): 1386-98.
- Brigande, J. V., Kiernan, A. E., Gao, X., Iten, L. E. and Fekete, D. M. (2000). "Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: do compartment boundaries play a role?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 11700-6.
- Brunet, J. F. and Ghysen, A. (1999). "Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity." *Bioessays* 21(4): 313-8.
- Camarero, G., Avendano, C., Fernandez-Moreno, C., Villar, A., Contreras, J., De Pablo, F., Pichel, J. G. and Varela-Nieto, I. (2001). "Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice." *J Neurosci* 21(19): 7630-41.

- Camarero, G., Leon, Y., Gorospe, I., De Pablo, F., Alsina, B., Giraldez, F. and Varela-Nieto, I. (2003). "Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons." *Dev Biol* 262(2): 242-53.
- Camarero, G., Villar, M. A., Contreras, J., Fernandez-Moreno, C., Pichel, J. G., Avendano, C. and Varela-Nieto, I. (2002). "Cochlear abnormalities in insulin-like growth factor-1 mouse mutants." *Hear Res* 170(1-2): 2-11.
- Campos-Ortega, J. A. (1995). "Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*." *Mol Neurobiol* 10(2-3): 75-89.
- Campuzano, S. and Modolelli, J. (1992). "Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex." *Trends Genet* 8(6): 202-8.
- Carney, P. R. and Couve, E. (1989). "Cell polarity changes and migration during early development of the avian peripheral auditory system." *Anat Rec* 225(2): 156-64.
- Cau, E., Casarosa, S. and Guillemot, F. (2002). "Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage." *Development* 129(8): 1871-80.
- Chae, J. H., Stein, G. H. and Lee, J. E. (2004). "NeuroD: the predicted and the surprising." *Mol Cells* 18(3): 271-88.
- Chao, M. V. and Bothwell, M. (2002). "Neurotrophins: to cleave or not to cleave." *Neuron* 33(1): 9-12.
- Cochran, S. L., Stone, J. S., Bermingham-McDonogh, O., Akers, S. R., Lefcort, F. and Rubel, E. W. (1999). "Ontogenetic expression of trk neurotrophin receptors in the chick auditory system." *J Comp Neurol* 413(2): 271-88.
- Cole, L. K., Le Roux, I., Nunes, F., Laufer, E., Lewis, J. and Wu, D. K. (2000). "Sensory organ generation in the chicken inner ear: contributions of bone morphogenetic protein 4, serrate1, and lunatic fringe." *J Comp Neurol* 424(3): 509-20.
- D'Amico-Martel, A. (1982). "Temporal patterns of neurogenesis in avian cranial sensory and autonomic ganglia." *Am J Anat* 163(4): 351-72.
- D'Amico-Martel, A. and Noden, D. M. (1983). "Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia." *Am J Anat* 166(4): 445-68.
- De Pablo, F. and De La Rosa, E. J. (1995). "The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors." *Trends Neurosci* 18(3): 143-50.
- Dufton, C., Marcora, E., Chae, J.H., McCullough, J., Eby, J., Hausburg, M., Stein, G.H., Khoo, S., Cobb, M.H. and Lee, J.E. (2005). "Context-dependent regulation of NeuroD activity and protein accumulation". *Mol and Cel Neuroscience* 28: 727-36.
- Eivers, E., McCarthy, K., Glynn, C., Nolan, C. M. and Byrnes, L. (2004). "Insulin-like growth factor (IGF) signalling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo." *Int J Dev Biol* 48(10): 1131-40.
- Fekete, D. M. and Wu, D. K. (2002). "Revisiting cell fate specification in the inner ear." *Curr Opin Neurobiol* 12(1): 35-42.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., Lemeur, M., Goriadis, C. and Guillemot, F. (1998). "The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons." *Neuron* 20(3): 483-94.
- Frago, L. M., Canon, S., De La Rosa, E. J., Leon, Y. and Varela-Nieto, I. (2003). "Programmed cell death in the developing inner ear is balanced by nerve growth factor and insulin-like growth factor I." *J Cell Sci* 116(Pt 3): 475-86.
- Frago, L. M., Leon, Y., De La Rosa, E. J., Gomez-Munoz, A. and Varela-Nieto, I. (1998). "Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear." *J Cell Sci* 111 (Pt 5): 549-56.
- Fritsch, B., Beisel, K. W., Jones, K., Farinas, I., Maklad, A., Lee, J. and Reichardt, L. F. (2002). "Development and evolution of inner ear sensory epithelia and their innervation." *J Neurobiol* 53(2): 143-56.
- Fritsch, B., Silos-Santiago, I., Bianchi, L. M. and Farinas, I. (1997). "The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation." *Trends Neurosci* 20(4): 159-64.
- Fritsch, B., Tessarollo, L., Coppola, E. and Reichardt, L. F. (2004). "Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance." *Prog Brain Res* 146: 265-78.
- Gallagher, B. C., Henry, J. J. and Grainger, R. M. (1996). "Inductive processes leading to inner ear formation during *Xenopus* development." *Dev Biol* 175(1): 95-107.

- Garcia-Bellido, A. and Moscoso Del Prado, J. (1979). "Genetic analysis of maternal information in *Drosophila*." *Nature* 278(5702): 346-8.
- Groves, A. K. and Bronner-Fraser, M. (2000). "Competence, specification and commitment in otic placode induction." *Development* 127(16): 3489-99.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. and Kageyama, R. (2001). "Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type." *Development* 128(8): 1313-22.
- Hemond, S. G. and Morest, D. K. (1991). "Ganglion formation from the otic placode and the otic crest in the chick embryo: mitosis, migration, and the basal lamina." *Anat Embryol (Berl)* 184(1): 1-13.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. and Ish-Horowicz, D. (1995). "Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick." *Nature* 375(6534): 787-90.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J. (1997). "Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina." *Curr Biol* 7(9): 661-70.
- Hensey, C. and Gautier, J. (1997). "A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation." *Mech Dev* 69(1-2): 183-95.
- Hernandez-Sanchez, C., Lopez-Carranza, A., Alarcon, C., De La Rosa, E. J. and De Pablo, F. (1995). "Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21): 9834-8.
- Hidalgo-Sanchez, M., Alvarado-Mallart, R. and Alvarez, I. S. (2000). "Pax2, Otx2, Gbx2 and Fgf8 expression in early otic vesicle development." *Mech Dev* 95(1-2): 225-9.
- Hilfer, S. R., Esteves, R. A. and Sanzo, J. F. (1989). "Invagination of the otic placode: normal development and experimental manipulation." *J Exp Zool* 251(2): 253-64.
- Holzenberger, M. and Lapointe, F. (2000). "Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II in the avian brain: relationship of in situ hybridization patterns with IGF type 1 receptor expression" *Int J Dev Neurosci* 18: 69-82.
- Huang, H. P., Liu, M., El-Hodiri, H. M., Chu, K., Jamrich, M. and Tsai, M. J. (2000). "Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3." *Mol Cell Biol* 20(9): 3292-307.
- Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E. and Kageyama, R. (2002). "Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina." *Development* 129(4): 831-42.
- Inoue, T., Tanaka, T., Takeichi, M., Chisaka, O., Nakamura, S. and Osumi, N. (2001). "Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development." *Development* 128(4): 561-9.
- Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1994). "Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system." *Embo J* 13(8): 1799-805.
- Jacobson, A. G. (1963). "The Determination and Positioning of the Nose, Lens and Ear. I. Interactions within the Ectoderm, and between the Ectoderm and Underlying Tissues." *J Exp Zool* 154: 273-83.
- Jones, J. I. and Clemmons, D. R. (1995). "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions." *Endocr Rev* 16(1): 3-34.
- Kaneto, H., Sharma, A., Suzuma, K., Laybutt, D.R. and Xu, G. (2002). "Induction of c-Myc expression suppresses insulin gene transcription by inhibiting NeuroD/BETA2-mediated transcriptional activation." *J Biol Chem* 277: 12998-13006.
- Kim, W. Y., Fritsch, B., Serls, A., Bakel, L. A., Huang, E. J., Reichardt, L. F., Barth, D. S. and Lee, J. E. (2001). "NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development." *Development* 128(3): 417-26.
- Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W. D. and Barbacid, M. (1994). "Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements." *Nature* 368(6468): 249-51.
- Knipper, M., Gestwa, L., Ten Cate, W. J., Lautermann, J., Brugger, H., Maier, H., Zimmermann, U., Rohbock, K., Kopschall, I., Wiechers, B. and Zenner, H. P. (1999). "Distinct thyroid

- hormone-dependent expression of TrkB and p75NGFR in nonneuronal cells during the critical TH-dependent period of the cochlea." *J Neurobiol* 38(3): 338-56.
- Ladher, R. K., Wright, T. J., Moon, A. M., Mansour, S. L. and Schoenwolf, G. C. (2005). "FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse." *Genes Dev* 19(5): 603-13.
- Lang, H., Bever, M. M. and Fekete, D. M. (2000). "Cell proliferation and cell death in the developing chick inner ear: spatial and temporal patterns." *J Comp Neurol* 417(2): 205-20.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O. E., Yeo, C. Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U. K., Fallon, J. F. and Tabin, C. (1997). "Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation." *Nature* 386(6623): 366-73.
- Lawoko-Kerali, G., Rivolta, M. N., Lawlor, P., Cacchiarelli-Rivolta, D. I., Langton-Hewer, C., Van Doorninck, J. H. and Holley, M. C. (2004). "GATA3 and NeuroD distinguish auditory and vestibular neurons during development of the mammalian inner ear." *Mech Dev* 121(3): 287-99.
- Lee, F. S., Kim, A. H., Khursigara, G. and Chao, M. V. (2001). "The uniqueness of being a neurotrophin receptor." *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 281-6.
- Lee, J. E. (1997). "Basic helix-loop-helix genes in neural development." *Curr Opin Neurobiol* 7(1): 13-20.
- Lee, M. K., Tuttle, J. B., Rebhun, L. I., Cleveland, D. W. and Frankfurter, A. (1990). "The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis." *Cell Motil Cytoskeleton* 17(2): 118-32.
- Lee, S. K. and Pfaff, S. L. (2003). "Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors." *Neuron* 38(5): 731-45.
- Lefcort, F., Clary, D. O., Rusoff, A. C. and Reichardt, L. F. (1996). "Inhibition of the NT-3 receptor TrkC, early in chick embryogenesis, results in severe reductions in multiple neuronal subpopulations in the dorsal root ganglia." *J Neurosci* 16(11): 3704-13.
- Leon, Y., Sanchez-Galiano, S. and Gorospe, I. (2004). "Programmed cell death in the development of the vertebrate inner ear." *Apoptosis* 9(3): 255-64.
- Leon, Y., Sanz, C., Frago, L. M., Camarero, G., Canon, S., Varela-Nieto, I. and Giraldez, F. (1999). "Involvement of insulin-like growth factor-I in inner ear organogenesis and regeneration." *Hum Metab Res* 31(2-3): 126-32.
- Leon, Y., Sanz, C., Giraldez, F. and Varela-Nieto, I. (1998). "Induction of cell growth by insulin and insulin-like growth factor-I is associated with Jun expression in the otic vesicle." *J Comp Neurol* 398(3): 323-32.
- Leon, Y., Vazquez, E., Sanz, C., Vega, J. A., Mato, J. M., Giraldez, F., Represa, J. and Varela-Nieto, I. (1995). "Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression." *Endocrinology* 136(8): 3494-503.
- Levine, E. M. (2004). "Cell cycling through development." *Development* 131(10): 2241-6.
- Lewin, G. R. and Barde, Y. A. (1996). "Physiology of the neurotrophins." *Annu Rev Neurosci* 19: 289-317.
- Li, H., Liu, H., Sage, C., Huang, M., Chen, Z. Y. and Heller, S. (2004). "Islet-1 expression in the developing chicken inner ear." *J Comp Neurol* 477(1): 1-10.
- Li, S. L., Kato, J., Paz, I. B., Kasuya, J. and Fujita-Yamaguchi, Y. (1993). "Two new monoclonal antibodies against the alpha subunit of the human insulin-like growth factor-I receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 196(1): 92-8.
- Liu, J. L., Grinberg, A., Westphal, H., Sauer, B., Accili, D., Karas, M. and Leroith, D. (1998). "Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice." *Mol Endocrinol* 12(9): 1452-62.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. (1993). "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)." *Cell* 75(1): 59-72.
- Liu, M., Pereira, F. A., Price, S. D., Chu, M. J., Shope, C., Himes, D., Eatock, R. A., Brownell, W. E., Lysakowski, A. and Tsai, M. J. (2000). "Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems." *Genes Dev* 14(22): 2839-54.

- Ma, Q., Chen, Z., Del Barco Barrantes, I., De La Pompa, J. L. and Anderson, D. J. (1998). "neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia." *Neuron* 20(3): 469-82.
- Maroon, H., Walshe, J., Mahmood, R., Kiefer, P., Dickson, C. and Mason, I. (2002). "Fgf3 and Fgf8 are required together for formation of the otic placode and vesicle." *Development* 129(9): 2099-108.
- Marovitz, W. F., Khan, K. M. and Schulte, T. (1977). "Ultrastructural development of the early rat otocyst." *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 86(1 Pt 2 Suppl 35): 9-28.
- Meier, S. (1978). "Development of the embryonic chick otic placode. II. Electron microscopic analysis." *Anat Rec* 191(4): 459-77.
- Memberg, S. P. and Hall, A. K. (1995). "Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin." *J Neurobiol* 27(1): 26-43.
- Miura, T., Shiota, K. and Morriss-Kay, G. (2004). "A mesenchyme-free culture system to elucidate the mechanism of otic vesicle morphogenesis." *J Anat* 205(4): 297-312.
- Mutoh, H., Naya, F. J., Tsai, M. J. and Leiter, A. B. (1998). "The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells." *Genes Dev* 12(6): 820-30.
- Nakae, J., Kido, Y. and Accili, D. (2001). "Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors." *Endocr Rev* 22(6): 818-35.
- Nakamura, S., Takeda, Y., Kanno, M., Yoshida, T., Ohtake, S., Kobayashi, K., Okabe, Y. and Matsuda, T. (1991). "Application of bromodeoxyuridine (BrdU) and anti-BrdU monoclonal antibody for the in vivo analysis of proliferative characteristics of human leukemia cells in bone marrows." *Oncology* 48(4): 285-9.
- Noden, D. M. (1983). "The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues." *Dev Biol* 96(1): 144-65.
- Noramly, S. and Grainger, R. M. (2002). "Determination of the embryonic inner ear." *J Neurobiol* 53(2): 100-28.
- Ornitz, D. M. and Itoh, N. (2001). "Fibroblast growth factors." *Genome Biol* 2(3): REVIEWS3005.
- Pera, E. M., Ikeda, A., Eivers, E. and De Robertis, E. M. (2003). "Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction." *Genes Dev* 17(24): 3023-8.
- Phelps, P. D. (1999). "The common cavity deformity of the ear. A precursor of meningitis but now being implanted." *Jbr-Btr* 82(5): 239-40.
- Phillips, B. T., Bolding, K. and Riley, B. B. (2001). "Zebrafish fgf3 and fgf8 encode redundant functions required for otic placode induction." *Dev Biol* 235(2): 351-65.
- Pietrzkowski, Z., Wernicke, D., Porcu, P., Jameson, B. A. and Baserga, R. (1992). "Inhibition of cellular proliferation by peptide analogues of insulin-like growth factor 1." *Cancer Res* 52(23): 6447-51.
- Pinon, L. G. and Linden, R. (1996). "Target and afferents interact to control developmental cell death in the mesencephalic parabigeminal nucleus of the rat." *J Neurosci Res* 45(2): 174-82.
- Pirvola, U., Hallbook, F., Xing-Qun, L., Virkkala, J., Saarna, M. and Ylikoski, J. (1997). "Expression of neurotrophins and Trk receptors in the developing, adult, and regenerating avian cochlea." *J Neurobiol* 33(7): 1019-33.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N. and Stewart, T. A. (1993). "IGF-I is required for normal embryonic growth in mice." *Genes Dev* 7(12B): 2609-17.
- Raballo, R., Rhee, J., Lyn-Cook, R., Leckman, J. F., Schwartz, M. L. and Vaccarino, F. M. (2000). "Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex." *J Neurosci* 20(13): 5012-23.
- Represa, A., Tremblay, E. and Ben-Ari, Y. (1990). "Sprouting of mossy fibers in the hippocampus of epileptic human and rat." *Adv Exp Med Biol* 268: 419-24.
- Represa, J., Avila, M. A., Romero, G., Mato, J. M., Giraldez, F. and Varela-Nieto, I. (1993). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 induce cell proliferation in the cochleovestibular ganglion through a glycosyl-phosphatidylinositol signaling system." *Dev Biol* 159(1): 257-65.
- Represa, J., Van De Water, T. R. and Bernd, P. (1991). "Temporal pattern of nerve growth factor receptor expression in developing cochlear and vestibular ganglia in quail and mouse." *Anat Embryol (Berl)* 184(5): 421-32.

- Represa JJ, Moro JA, Pastor F, Gato A, Barbosa E.** (1990) "Patterns of epithelial cell death during early development of the human inner ear". *Ann Oto Rhinol Laryn* 99: 482-488.
- Ridyard, M. S. and Robbins, S. M.** (2003). "Fibroblast growth factor-2-induced signaling through lipid raft-associated fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2)." *J Biol Chem* 278(16): 13803-9.
- Riley, B. B. and Phillips, B. T.** (2003). "Ringing in the new ear: resolution of cell interactions in otic development." *Dev Biol* 261(2): 289-312.
- Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M. and Matter, J. M.** (1997). "NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis." *Development* 124(17): 3263-72.
- Rubel, E. W. and Fritzsche, B.** (2002). "Auditory system development: primary auditory neurons and their targets." *Annu Rev Neurosci* 25: 51-101.
- Sanchez-Calderon, H., Martin-Partido, G. and Hidalgo-Sanchez, M.** (2004). "Otx2, Gbx2, and Fgf8 expression patterns in the chick developing inner ear and their possible roles in otic specification and early innervation." *Gene Expr Patterns* 4(6): 659-69.
- Sanz, C., Leon, Y., Canon, S., Alvarez, L., Giraldez, F. and Varela-Nieto, I.** (1999a). "Pattern of expression of the jun family of transcription factors during the early development of the inner ear: implications in apoptosis." *J Cell Sci* 112 (Pt 22): 3967-74.
- Sanz, C., Leon, Y., Troppmair, J., Rapp, U. R. and Varela-Nieto, I.** (1999b). "Strict regulation of c-Raf kinase levels is required for early organogenesis of the vertebrate inner ear." *Oncogene* 18(2): 429-37.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. and Nakanishi, S.** (1992). "Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split." *Genes Dev* 6(12B): 2620-34.
- Satoh, T. and Fekete, D. M.** (2005). "Clonal analysis of the relationships between mechanosensory cells and the neurons that innervate them in the chicken ear." *Development* 132(7): 1687-97.
- Schimmang, T., Alvarez-Bolado, G., Minichiello, L., Vazquez, E., Giraldez, F., Klein, R. and Represa, J.** (1997). "Survival of inner ear sensory neurons in trk mutant mice." *Mech Dev* 64(1-2): 77-85.
- Silos-Santiago, I., Fagan, A. M., Garber, M., Fritzsche, B. and Barbacid, M.** (1997). "Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors." *Eur J Neurosci* 9(10): 2045-56.
- Solomon, K. S., Kwak, S. J. and Fritz, A.** (2004). "Genetic interactions underlying otic placode induction and formation." *Dev Dyn* 230(3): 419-33.
- Stone, J. S., Shang, J. L. and Tomarev, S.** (2003). "Expression of Prox1 defines regions of the avian otocyst that give rise to sensory or neural cells." *J Comp Neurol* 460(4): 487-502.
- Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2000). "Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system." *Embo J* 19(20): 5460-72.
- Torres, M. and Giraldez, F.** (1998). "The development of the vertebrate inner ear." *Mech Dev* 71(1-2): 5-21.
- Varela-Nieto, I., De La Rosa, E. J., Valenciano, A. I. and Leon, Y.** (2003). "Cell death in the nervous system: lessons from insulin and insulin-like growth factors." *Mol Neurobiol* 28(1): 23-50.
- Varela-Nieto, I., Morales-Garcia, J. A., Vigil, P., Diaz-Casares, A., Gorospe, I., Sanchez-Galiano, S., Canon, S., Camarero, G., Contreras, J., Cediñel, R. and Leon, Y.** (2004). "Trophic effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the inner ear." *Hear Res* 196(1-2): 19-25.
- Von Bartheld, C. S.** (1990). "Development and innervation of the paratympanic organ (Vitali organ) in chick embryos." *Brain Behav Evol* 35(1): 1-15.
- Waseem, N. H. and Lane, D. P.** (1990). "Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form." *J Cell Sci* 96 (Pt 1): 121-9.
- Whitehead, M. C. and Morest, D. K.** (1985). "The development of innervation patterns in the avian cochlea." *Neuroscience* 14(1): 255-76.
- Wilson, S. I. and Edlund, T.** (2001). "Neural induction: toward a unifying mechanism." *Nat Neurosci* 4 Suppl: 1161-8.



- Woods, K. A., Camacho-Hubner, C., Barter, D., Clark, A. J. and Savage, M. O. (1997).** "Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature." *Acta Paediatr Suppl* 423: 39-45.
- Woods, K. A., Camacho-Hubner, C., Savage, M. O. and Clark, A. J. (1996).** "Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene." *N Engl J Med* 335(18): 1363-7.
- Wright, T. J. and Mansour, S. L. (2003).** "Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction." *Development* 130(15): 3379-90.
- Wu, D. K. and Oh, S. H. (1996).** "Sensory organ generation in the chick inner ear." *J Neurosci* 16(20): 6454-62.
- Yamamoto, Y. and Henderson, C. E. (1999).** "Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat." *Dev Biol* 214(1): 60-71.
- Yaneza, M., Gilthorpe, J. D., Lumsden, A. and Tucker, A. S. (2002).** "No evidence for ventrally migrating neural tube cells from the mid- and hindbrain." *Dev Dyn* 223(1): 163-7.
- Yao, L., Zhang, D. and Bernd, P. (1994).** "The onset of neurotrophin and trk mRNA expression in early embryonic tissues of the quail." *Dev Biol* 165(2): 727-30.